

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

IMPLICATION DE LA MÉLANOTRANSFERRINE DANS LA PROGRESSION  
TUMORALE :  
IDENTIFICATION D'UNE NOUVELLE CIBLE THÉRAPEUTIQUE

THÈSE  
PRÉSENTÉE  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DU DOCTORAT EN BIOCHIMIE

PAR  
Yannève ROLLAND

MARS 2009

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, Dr Richard Béliveau, de m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour son enthousiasme extraordinaire pour la recherche. Je remercie également Dr Michel Demeule de m'avoir supervisée au cours de ma maîtrise et de mon doctorat. Je lui adresse toute ma reconnaissance pour son intérêt scientifique et sa disponibilité. Je remercie Dr Roméo Ceccheli et Dr Laurence Fenart pour avoir fourni l'expertise du modèle *in vitro* de barrière hémato-encéphalique. Je tiens également à remercier Normand Lapierre pour avoir partager avec moi son expertise. Je témoigne toute mon amitié et ma reconnaissance aux membres du Laboratoire de Médecine Moléculaire. Je remercie ma famille pour leur soutien et leur amour. Enfin, je remercie le département de chimie de l'UQAM, Gestion Valéo, Valorisation-Recherche Québec (VRQ) de même que le Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et Génie du Canada (CRSNG) pour leur soutien financier.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	v
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	vii
<b>LISTE DES ABBRÉVIATIONS</b> .....	viii
<b>RÉSUMÉ</b> .....	xi

### CHAPITRE I

<b>INTRODUCTION</b> .....	1
1.1 La progression tumorale .....	1
1.1.1 Le système d'activation du plasminogène .....	2
1.1.2 Le rôle des métalloprotéases matricielles .....	12
1.2 Les mécanismes associés à l'angiogenèse .....	14
1.2.1 Structure du réseau vasculaire .....	15
1.2.2 Principe de l'angiogenèse tumorale.....	18
1.2.3 Les principaux joueurs impliqués dans l'angiogenèse tumorale .....	20
1.2.4 La migration des cellules endothéliales .....	21
1.2.5 Les stratégies anti-angiogéniques .....	22
1.3 Le développement métastatique .....	23
1.3.1 Particularités des métastases cérébrales.....	27
1.4 La mélanotransferrine.....	30
1.4.1 Organisation génomique et moléculaire de la mélanotransferrine .....	30
1.4.2 Structure protéique de la mélanotransferrine humaine.....	31
1.4.2 Activité biologique de la mélanotransferrine humaine.....	33
1.5 Hypothèses de travail et objectifs expérimentaux .....	41

## CHAPITRE II

<b>ARTICLES .....</b>	<b>43</b>
2.1 Melanotransferrin stimulates t-PA-dependent activation of plasminogen in endothelial cells leading to cell detachment.....	44
2.2 Inhibition of tumor growth by a truncated and soluble form of melanotransferrin .....	71
2.3 Inhibition of melanoma brain metastasis by targeting melanotransferrin at the cell surface .....	104

## CHAPITRE III

<b>DISCUSSION .....</b>	<b>142</b>
3.1 La sMTf recombinante induit le détachement des cellules endothéliales en stimulant l'activation du plasminogène par le tPA.....	143
3.2 La sMTf inhibe l'angiogenèse et la croissance tumorale.....	146
3.3 L'expression de la MTf à la surface des mélanomes favorise le développement de métastases cérébrales.....	151

## CHAPITRE IV

<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>156</b>
--	------------

## APPENDICE A

<b>CONTRIBUTIONS.....</b>	<b>160</b>
---------------------------	------------

<b>RÉFÉRENCES .....</b>	<b>161</b>
-------------------------	------------

## LISTE DES FIGURES

### CHAPITRE I

<b>Figure 1.1</b> Caractéristiques structurales du plasminogène et de ses dérivés. ....	4
<b>Figure 1.2</b> La cascade d'activation du plasminogène.....	6
<b>Figure 1.3</b> Internalisation et recyclage de l'uPAR à la surface cellulaire. ....	9
<b>Figure 1.4</b> Morphologie des vaisseaux sanguins du système vasculaire. ....	16
<b>Figure 1.5</b> Structures des capillaires sanguins.....	17
<b>Figure 1.6</b> Le développement métastatique. ....	26
<b>Figure 1.7</b> Coupe d'un capillaire cérébral. ....	28
<b>Figure 1.8</b> Structure protéique de la mélanotransferrine humaine.....	31
<b>Figure 1.9</b> Représentation schématique de la dichotomie de la mélanotransferrine.....	38
<b>Figure 1.10</b> Modèle <i>in vitro</i> de la BHE. ....	42

### CHAPITRE II

#### **2.1 Melanotransferrin stimulates t-PA-dependent activation of plasminogen in endothelial cells leading to cell detachment**

<b>Figure 1.</b> sMTf treatment triggers plasmin formation in HMEC-1. ....	66
<b>Figure 2.</b> Increase of plasmin formation by sMTf leads to the degradation of fibronectin. ..	67
<b>Figure 3.</b> Higher levels of plasmin induce endothelial cell detachment.....	68
<b>Figure 4.</b> Modulation of plasminogen activation by various inhibitors.....	69
<b>Figure 5.</b> The MMP activation system is a key player in EC detachment.....	70

#### **2.2 Inhibition of tumor growth by a truncated and soluble form of melanotransferrin**

<b>Figure 1.</b> Inhibition of bFGF- and VEGF-induced neovascularization by sMTf treatment. .	96
<b>Figure 2.</b> Inhibition of tumor growth by sMTf.....	97
<b>Figure 3.</b> sMTf treatment reduces angiogenesis in vivo.....	99

<b>Figure 4.</b> MTf expression correlates with cell invasion <i>in vivo</i> . .....	100
<b>Figure 5.</b> Effects of sMTf on tumor cell migratory properties. ....	101
<b>Figure 6.</b> sMTf treatment affects the u-PAR/LRP system in endothelial and large lung carcinoma cells. ....	102

### **2.3 Inhibition of melanoma brain metastasis by targeting melanotransferrin at the cell surface**

<b>Figure 1.</b> MTf expression at the surface of CHO cells promotes cell invasion <i>in vivo</i> . ....	134
<b>Figure 2.</b> Intravenous human melanoma cells produce brain metastasis in nude mice. ....	135
<b>Figure 3.</b> Monoclonal antibody L235 reduces the establishment of melanoma brain metastasis. ....	136
<b>Figure 4.</b> Plasma concentration of mAb L235 in nude mice. ....	137
<b>Figure 5.</b> Membrane-bound melanotransferrin facilitates blood-brain barrier invasion <i>in vitro</i> . ....	138
<b>Figure 6.</b> Monoclonal antibody L235 inhibits transmigration of MTf-expressing cells across the blood-brain barrier <i>in vitro</i> . ....	139
<b>Figure 7.</b> Down-regulation of MTf expression in melanoma cells reduces cell transmigration ability. ....	140
<b>Figure 8.</b> Transmigration of MTf-expressing cells across the BBB <i>in vitro</i> involves the participation of plasminogen and MMP activation systems. ....	141

## LISTE DES TABLEAUX

### CHAPITRE I

<b>Tableau 1.1</b> Dissémination métastatique par la sélectivité des organes hôtes.....	25
---	----

### CHAPITRE II

<b>2.2</b> Inhibition of tumor growth by a truncated and soluble form of melanotransferrin	
--	--

<b>Tableau 1.</b> Inhibition of tumor growth by sMTf. ....	98
--	----

<b>2.3</b> Inhibition of melanoma brain metastasis by targeting melanotransferrin at the cell surface	
---	--

<b>Tableau 1.</b> Pharmacokinetic parameters of [ <sup>125</sup> I]-L235 mAb in plasma of female athymic nude mice .....	130
--	-----



## ABRÉVIATIONS

A-549	Lignée cellulaire d'adénocarcinome pulmonaire humain ( <i>small cell</i> )
a.a.	Acide aminé
ADN	Acide déoxyribonucléique (DNA)
AUC	Aire sous la courbe
BBCEC	Cellules endothéliales de capillaires cérébraux bovins
bFGF	Facteur de croissance basique des fibroblastes
BHE	Barrière hémato-encéphalique
cDNA	ADN complémentaire
CE	Cellules endothéliales
CHO	Cellules ovariennes de Hamster Chinois ( <i>Chinese hamster ovary cells</i> )
CL	Clairance plasmatique
C <sub>max</sub>	Concentration maximale
CS	Sérum de veau
Da	Dalton (g/mol)
EACA ou εACA	Acide ε-amino-n-caproïque
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
EGF	Facteur de croissance épidermique
ERK	Kinase régulée par des signaux extracellulaires
FAK	Kinase d'adhésion focale
FBS	Sérum de fœtus de bovin
FN	Fibronectine
Flt-1	Récepteur 1 du VEGF (VEGFR-1)
Flk-1	Récepteur 2 du VEGF (VEGFR-2)
GPI	Groupelement glycosyle phosphatidylinositol
Hb	Hémoglobine
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid</i>
HIF-1	Facteur 1 induit par l'hypoxie
HMEC-1	Cellules endothéliales microvasculaires humaines ( <i>Human microvascular</i> )

	<i>endothelial cell-1)</i>
IGF	Facteur de croissance insulinique
IgG	Immunoglobuline-G
Lf	Lactoferrine
LDL	Lipoprotéine de faible densité
LDL-R	Récepteur des LDL
LRP	Protéine apparentée au récepteur lipoprotéique de faible densité
mAb	Anticorps monoclonal
MEC	Matrice extracellulaire
MEM	Milieu essentiel minimal
MMP	Métalloprotéase matricielle
mMTf	MTf membranaire
mRNA	ARN messenger
MRP	Protéine associée à la résistance aux médicaments
MTf	Mélanotransferrine
MT-MMP	Métalloprotéase matricielle membranaire
NCI H460	Lignée cellulaire de carcinome pulmonaire humain ( <i>large cell</i> )
P	Valeur de probabilité statistique
p97	Mélanotransferrine
PAF	Facteur activatur des plaquettes
PAI-1	Inhibiteur des activateurs du plasminogène de type I
p.b.	Paire de bases
PBS	Tampon salin phosphate
PBS-CMF	PBS sans calcium ni magnésium
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
P-gp	Glycoprotéine-P
RAP	Protéine associée au récepteur
R/H	Ringer/HEPES
RNA	Acide ribonucléique
RT-PCR	Transcription inverse- réaction en chaîne de polymérase
SD	Déviation standard
SDS-PAGE	Électrophorèse de gel de polyacrylamide au sodium dodecyl sulfate
SE	Erreur standard
SK-Mel-28	Lignée cellulaire de mélanome humain

sMTf	Forme recombinante tronquée et soluble de la MTf
SNC	Système nerveux central
$t_{1/2}$	Temps de demie-vie éliminatoire
Tf	Transferrine
TGF- $\beta$	Facteur de croissance transformant $\beta$
TIMP	Inhibiteur tissulaire des MMP
TNF- $\alpha$	Facteur de nécrose tumorale $\alpha$
$t_{\max}$	Temps requis pour atteindre $C_{\max}$
tPA	Activateur du plasminogène de type tissulaire
U-87 MG	Lignée cellulaire de glioblastome multiforme humain
uPA	Activateur du plasminogène de type urokinase
uPAR	Récepteur de l'activateur de l'u-PA
Vd	Volume de distribution
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VEGFR	Récepteur du VEGF

## RÉSUMÉ

La mélanotransferrine (MTf) a tout d'abord été identifiée comme étant un antigène majeur des mélanomes. Son expression a par la suite été rapportée dans plusieurs cellules néoplasiques et quelques tissus sains. Bien que la majorité de la MTf soit associée à la membrane plasmique, une faible portion est sécrétée dans le milieu extracellulaire sous forme soluble. Notre équipe a récemment démontré que la MTf régule l'activation du plasminogène et la motilité cellulaire *in vitro*. Les activateurs du plasminogène sécrétés par les cellules cancéreuses catalysent la conversion du plasminogène en protéase active. La plasmine joue un rôle central dans la progression tumorale en dégradant les protéines de la membrane basale et de la matrice extracellulaire (MEC). Ce remodelage tissulaire facilite grandement l'angiogenèse et l'invasion des cellules cancéreuses vers les tissus adjacents.

Le premier objectif de cette thèse fut de démontrer que la MTf favorise l'activation du plasminogène par son activateur de type tissulaire (tPA). À cet effet, une forme recombinante tronquée de la MTf (sMTf) a été utilisée. En présence de plasminogène et de tPA, la sMTf stimule la formation de plasmine dans le milieu extracellulaire de cellules endothéliales (CE) et accroît la dégradation de la fibronectine, une des composantes de la MEC. La dégradation de la MEC conduit au détachement des CE et à leur mort par anoïkis. Ces données suggèrent que la sMTf possède des propriétés anti-angiogéniques en induisant l'anoïkis des CE.

Nous avons ensuite évalué ses effets sur le développement angiogénique et sur la croissance tumorale *in vivo*. Les résultats montrent que la sMTf inhibe significativement la croissance de tumeurs sous-cutanées dérivées de glioblastome et de carcinome pulmonaire humains chez la souris immunosupprimée. Nous démontrons également que le traitement à la sMTf entraîne une réduction de l'expression du marqueur vasculaire d'endogline, de même qu'une diminution de la quantité d'hémoglobine au sein des tumeurs sous-cutanées de glioblastomes. L'ensemble de ces résultats démontre clairement que la sMTf réduit l'angiogenèse et la croissance tumorale *in vivo*.

Tout comme la forme recombinante tronquée, la MTf membranaire (mMTf) interagit avec le système d'activation du plasminogène. La formation de plasmine à proximité de la membrane plasmique favorise l'invasion des cellules tumorales et le développement métastatique. La participation de la mMTf dans la formation de métastases cérébrales a donc été évaluée pour une lignée cellulaire de mélanome humain. Les résultats indiquent la présence de cellules exprimant la MTf humaine dans les cerveaux de souris ayant reçu une injection intraveineuse de cellules de mélanome humain. De même, l'administration d'un anticorps monoclonal dirigé contre la MTf humaine (L235) a réduit de moitié le développement de métastases cérébrales de mélanomes chez la souris. Ces résultats

démontrent que l'implication de la mMTf dans l'activation du plasminogène faciliterait la migration des cellules cancéreuses à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE) et l'invasion du système nerveux central.

Les principales contributions de ce travail sont d'avoir démontré d'une part que la sMTf induit le détachement des cellules endothéliales par stimulation de la cascade d'activation du plasminogène. D'autre part, la sMTf entraîne l'inhibition du développement angiogénique et de la croissance tumorale chez la souris. Puis, l'expression de la MTf à la surface des cellules cancéreuses facilite leur migration à travers la BHE dans le but de produire des métastases cérébrales. Cette étude identifie la MTf clairement comme une cible intéressante dans la progression tumorale, tout en suggérant des outils thérapeutiques comme la sMTf recombinante ou une forme humanisée du L235.

Mots clés : croissance tumorale, angiogenèse, métastases cérébrales, barrière hémato-encéphalique, mélanotransferrine, mélanome, plasminogène.

## CHAPITRE I

### INTRODUCTION

Le développement d'un organisme repose sur plusieurs processus dont la prolifération et la mort cellulaire. Certains agents cancérigènes d'origine physique, infectieuse ou chimique peuvent altérer les mécanismes de régulation de ces procédés et conduire à un comportement cellulaire incontrôlé (Tzen *et al.*, 1988; Vogelstein et Kinzler, 1993). La multiplication anarchique des cellules peut mener à l'apparition de tumeurs bénignes ou malignes, ces dernières étant caractérisées par l'invasion et la destruction des structures tissulaires adjacentes (Spandidos, 1986). Le cancer représente l'une des causes de décès les plus répandues à travers le monde. Au Canada, près de 46% des décès sont attribués au cancer et les taux d'incidence actuels indiquent qu'un canadien sur quatre succombera des suites de cette maladie (Société Canadienne du cancer/Institut national du cancer du Canada, statistiques canadiennes sur le cancer 2008). Plus de la moitié des nouveaux cas de cancer est attribuable à trois types en particulier, à savoir les cancers de la prostate, du poumon et du côlon. Les principales complications associées à cette pathologie demeurent la résistance aux thérapies traditionnelles de même que l'apparition de métastases (Blagosklonny, 2005). Une meilleure compréhension des différentes étapes essentielles à la progression tumorale permettrait l'élaboration de nouveaux outils thérapeutiques.

#### 1.1 La progression tumorale

L'étude du mécanisme d'action des carcinogènes a permis de distinguer les étapes successives conduisant à la formation d'un cancer. On distingue ainsi trois étapes essentielles indépendantes : l'initiation, la promotion et la progression tumorale. L'initiation est le

processus au cours duquel une cellule acquiert une anomalie génétique – généralement une mutation d’une seule paire de base au sein de l’ADN – qui est dès lors transmise à sa descendance. La prolifération cellulaire permet en quelque sorte d’entériner le phénomène d’initiation. La majorité des cellules-filles possédant l’anomalie génétique est éliminée et meurt par apoptose. Toutefois, seule la promotion des cellules dites initiées conduit à la formation d’amas cellulaires ou de tumeurs bénignes. Les agents promoteurs n’ont généralement pas d’action directe sur l’ADN, mais peuvent convertir une cellule initiée en cellule maligne. Les agents promoteurs peuvent se présenter sous la forme de facteurs de croissance et peuvent être régulés autant de manière autocrine que paracrine. La transformation maligne d’une cellule ou d’un tissu sain est généralement associée à un aspect histologique hétérogène. Parmi les caractéristiques distinguant les cellules néoplasiques, on remarque une hyperploïdie, une taille hétérogène, de même qu’une augmentation du rapport cyto-nucléaire. Par ailleurs, les cellules cancéreuses présentent une perte de l’inhibition de contact, une modification de l’adhésivité et des antigènes de surface (Cavallaro, Liebner et Dejana, 2006). Les cellules malignes possèdent également un taux élevé, anarchique et indéfini de mitose (Classon et Harlow, 2002). La tumeur pré-cancéreuse acquiert une indépendance de croissance et une importante instabilité génétique (Tsatsas et Kaye, 2003; Pedraza-Farina, 2006). La progression tumorale englobe les diverses étapes de la croissance d’une lésion cancéreuse, soit la vascularisation de la tumeur, l’invasion locale par la sécrétion d’enzymes protéolytiques, l’accès à la circulation sanguine, et la dissémination métastatique.

### *1.1.1 Le système d’activation du plasminogène*

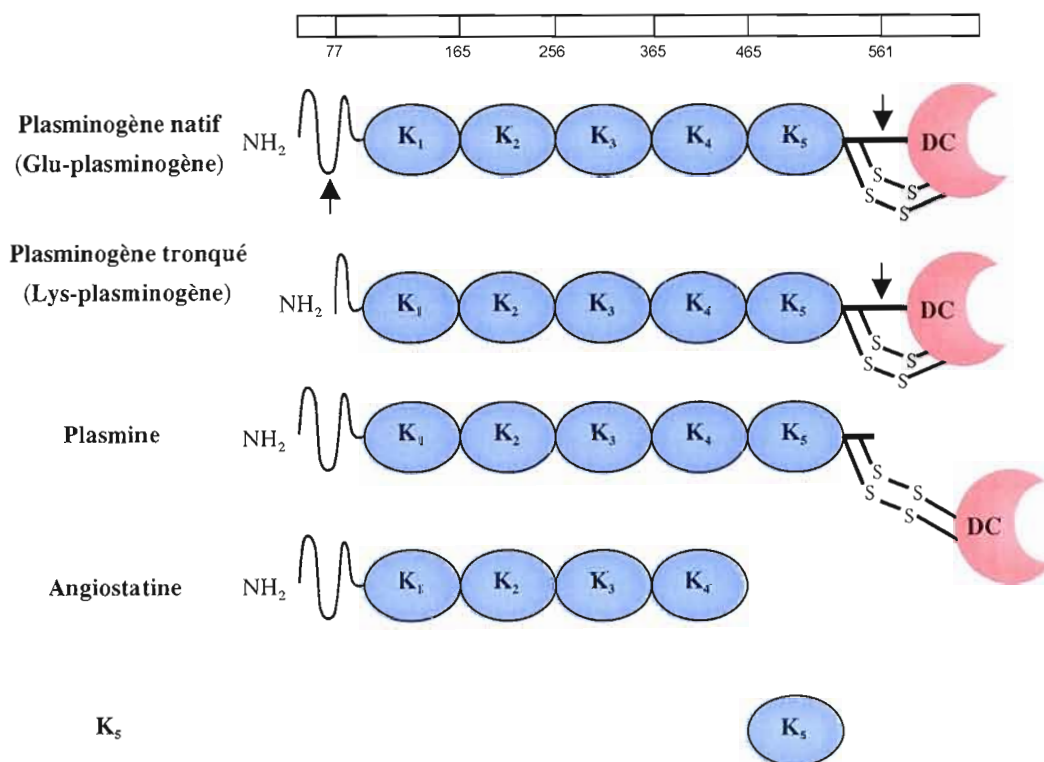
La cascade d’activation du plasminogène menant à la formation de plasmine est un système ubiquitaire qui joue un rôle important dans l’angiogenèse, l’invasion tumorale et la dissémination métastatique (Mignatti, 1995; Blasi, 1997). Les activateurs du plasminogène catalysent la conversion du zymogène inactif en plasmine. Cette protéase dégrade par la suite les protéines de la MEC (Castellino et Ploplis, 2005) et favorise le développement angiogénique de même que l’invasion des cellules cancéreuses vers les tissus adjacents. De plus, l’activation directe de certaines métalloprotéases matricielles (MMP) par la plasmine

accroît davantage la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC).

#### *1.1.1.1 Le plasminogène et la plasmine*

Le plasminogène est une glycoprotéine à chaîne unique dont le poids moléculaire atteint 92 kDa. Ce zymogène inactif est principalement synthétisé par le foie et circule principalement dans le système vasculaire (concentration plasmatique estimée à 2  $\mu$ M) et dans l'espace interstitiel chez l'humain (Robbins et Summari, 1976; Andreasen *et al.*, 1997). La structure du plasminogène comprend un domaine N-terminal (chaîne A) qui renferme un peptide de pré-activation, cinq régions homologues nommées domaines *kringles*, puis un domaine catalytique commun aux protéases à sérine en C-terminale (chaîne B). La forme native du plasminogène possède un acide glutamique à son extrémité N-terminale (Glu-plasminogène). La coupure du peptide de pré-activation expose la lysine à la nouvelle extrémité N-terminale (Lys-plasminogène) et facilite l'activation du plasminogène en plasmine (Miles, Castellino et Gong, 2003). Le clivage peptidique du plasminogène entre les acides aminés Arg<sub>560</sub> et Val<sub>561</sub> génère une protéase dont l'activité est de  $10^4$  à  $10^6$  fois supérieure à celle de son précurseur (Moser *et al.*, 2002). La plasmine, dont le poids moléculaire relatif est de 90 kDa, est donc constituée de deux chaînes peptidiques reliées entre elles par deux ponts disulfures (Figure 1.1). La plasmine présente une activité à large spectre et peut dégrader plusieurs protéines de la MEC, telles que la fibronectine (FN), la vitronectine et la fibrine. De plus, cette protéase a la capacité d'activer certaines MMP de même que son propre précurseur, le plasminogène. La protéolyse du plasminogène et/ou de la plasmine conduit à la formation de plusieurs fragments, lesquels présentent des caractéristiques intéressantes. En effet, l'angiostatine, qui contient les trois ou quatre premiers domaines *kringles* de la plasmine, ainsi que le *kringle* K<sub>5</sub> possèdent des propriétés anti-angiogéniques (Tarui *et al.*, 2002; Perides *et al.*, 2006; Nguyen *et al.*, 2007).





**Figure 1.1** Caractéristiques structurales du plasminogène et de ses dérivés.

Le plasminogène est présent sous deux formes, soit le plasminogène natif circulant (Glu-plasminogène) et sa forme tronquée (Lys-plasminogène) produite par clivage au résidu 77. Le plasminogène possède cinq domaines homologues dits *kringles* ( $K_{1-5}$ ) et un domaine catalytique (DC) en C-terminal. L'activation du plasminogène en plasmine résulte du clivage du lien peptidique entre les acides aminés Arg<sub>560</sub> et Val<sub>561</sub>. Le clivage du glu-plasminogène en lys-plasminogène potentialise l'activation subséquente du zymogène en protéase active. La protéolyse du plasminogène génère également des fragments composés d'un ou plusieurs des domaines *kringles*. Illustration modifiée de Andreasen *et al.* (1997).

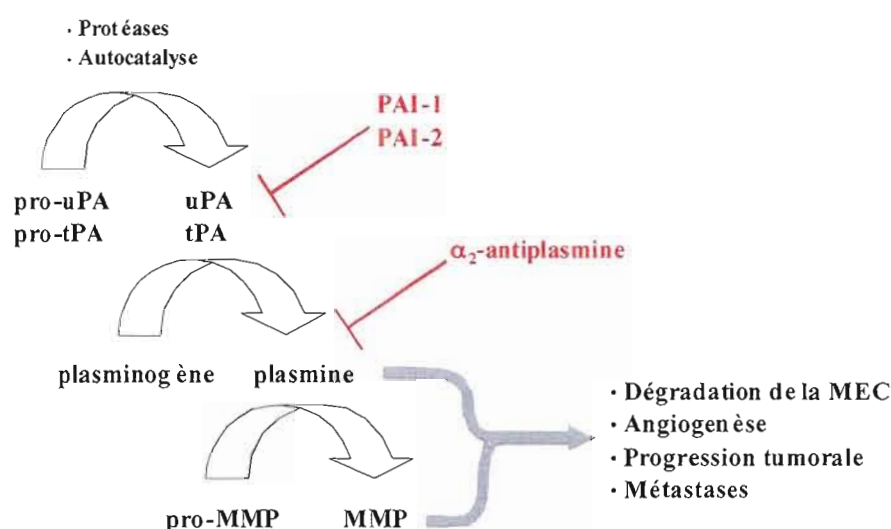
#### 1.1.1.2 Les activateurs du plasminogène

La conversion du plasminogène en plasmine peut être réalisée par l'action des activateurs de type urokinase (uPA) ou tissulaire (tPA). L'uPA est sécrété sous la forme d'une pro-enzyme par divers types cellulaires, dont les cellules tumorales (Andreasen *et al.*, 1997; Parfyonova, Plekhanova et Tkachuk, 2002). Initialement, le zymogène ne présente

qu'une chaîne unique (pro- ou sc-uPA) et le clivage du lien peptidique Lys<sub>158</sub>-Iso<sub>159</sub> génère la forme active à double chaîne (uPA, poids moléculaire relatif 50 kDa) (Dano *et al.*, 1985). Parmi les protéases catalysant cette conversion, on note la plasmine, la kallikréine, le Facteur XIIIa (Ichinose, Fujikawa et Suyama, 1986) et la cathepsine B (Kobayashi *et al.*, 1991). La molécule d'uPA active comporte une région homologue à l'EGF impliqué dans la liaison à son récepteur, un domaine *kringle* puis un domaine catalytique commun aux protéases à sérine en C-terminal. Comme pour la majorité des zymogènes, le pro-uPA possède une très faible capacité intrinsèque à activer son substrat naturel, le plasminogène (Petersen *et al.*, 1988). La liaison du pro-uPA à son récepteur l'uPAR favorise son activation par rapport à l'urokinase sous sa forme libre (Parfyonova, Plekhanova et Tkachuk, 2002). La majorité de l'uPA circulant (jusqu'à 20 pM dans le plasma) est associée à son inhibiteur PAI-1, tandis qu'une faible fraction se trouve sous la forme inactive pro-uPA (Andreasen *et al.*, 1994). Une expression accrue d'uPA a été identifiée dans les tissus cancéreux de sein, de côlon, d'ovaire, de rein et de cerveau par rapport aux niveaux retrouvés dans les tissus sains correspondant (Andreasen *et al.*, 1997). L'activation du plasminogène par l'uPA joue un rôle majeur dans la protéolyse extracellulaire. En effet, la formation de plasmine à proximité de la surface cellulaire (par le biais de l'uPAR) permet le clivage des principales composantes de la membrane basale. Ce processus est impliqué notamment dans le développement des glandes mammaires, l'ovulation et le cancer (Andreasen *et al.*, 1997; Bruse, Radu et Bergqvist, 2004). Cependant, maintes études indiquent que le rôle d'activation du plasminogène ne se limite pas au remodelage tissulaire. De concert avec l'uPAR, l'uPA peut effectivement stimuler la motilité ainsi que la prolifération cellulaire (Andreasen, Egelund et Petersen, 2000).

Le tPA est une protéase à sérine d'environ 70 kDa synthétisée principalement par les cellules endothéliales vasculaires sous la forme d'un pro-peptide à chaîne unique (pro-tPA ou sc-tPA). Le pro-tPA présente d'emblée une activité enzymatique importante qui est décuplée lors de sa conversion par protéolyse limitée en tPA à double chaîne (van Hinsbergh *et al.*, 1987). Les caractéristiques structurales du tPA comportent un *finger domain* (responsable de la liaison à la fibronectine), un domaine homologue aux facteurs de croissance et deux domaines *kringles* à l'extrémité N-terminale (chaîne A), de même qu'un domaine catalytique

en C-terminal (chaîne B). Bien que le tPA soit majoritairement associé au système fibrinolytique du fait qu'il possède une forte affinité envers la fibrine (Collen, 1999), il participerait également à la dégradation de la MEC lors du développement angiogénique (Sato *et al.*, 1993). Des études rapportent que le tPA peut être sécrété par plusieurs cellules néoplasiques, dont les cellules provenant de mélanomes (Rijken et Collen, 1981), de neuroblastomes (Neuman *et al.*, 1989), et des cancers ovariens (Amin, Karlan et Littlefield, 1987), mammaires et pancréatiques (Paciucci *et al.*, 1998).



**Figure 1.2** La cascade d'activation du plasminogène.

La conversion du plasminogène en plasmine est catalysée par l'action des activateurs de types tissulaire (tPA) et urokinase (uPA). La plasmine peut directement activer certaines pro-MMP afin de stimuler la dégradation de la MEC et favoriser le développement angiogénique et la progression tumorale. Illustration tirée de Myöhänen et Vaheri (Myohanen et Vaheri, 2004).

### 1.1.1.3 Les inhibiteurs du système plasminolytique

L'activation du plasminogène requiert une étroite régulation afin de maintenir l'équilibre protéolytique. Parmi les éléments régulateurs, deux inhibiteurs physiologiques ciblent l'uPA et le tPA afin de limiter l'activation du plasminogène (Figure 1.2). Les

inhibiteurs des activateurs du plasminogène de type 1 (PAI-1) et de type 2 (PAI-2) sont des glycoprotéines appartenant à la superfamille des serpins (inhibiteurs des protéases à sérine). Le PAI-1 est produit par une variété de types cellulaires dont les cellules endothéliales vasculaires et les plaquettes sanguines (Andreasen *et al.*, 1990). La concentration plasmatique de PAI-1 actif chez un sujet sain peut varier de 0 à 1,3 nmol/L. Cette glycoprotéine de 50 kDa est synthétisée sous une forme active qui est rapidement inactivée suite à la formation d'un complexe équimolaire avec l'uPA ou le tPA (Reinartz *et al.*, 1996). Bien que le mécanisme exact du PAI-1 demeure méconnu, ce dernier protégerait la MEC d'une dégradation excessive (Palmieri *et al.*, 2003). Par ailleurs, l'association du PAI-1 à la vitronectine stabilise son activité inhibitrice et la focalise au sein même de la MEC (Seiffert *et al.*, 1990). L'interaction entre le PAI-1 et les protéines de la MEC régulerait ainsi la migration cellulaire (Rakic *et al.*, 2003).

Pour sa part, le PAI-2 est présent sous deux formes distinctes encodées par un gène, mais dont les fonctions sont indiscernables. Le PAI-2 cytosolique est non glycosylé et affiche un poids moléculaire relatif de 42 kDa, tandis que la forme sécrétée est glycosylée et possède un poids moléculaire de 60 kDa (Ye, Wun et Sadler, 1988; Belin *et al.*, 1989). Bien que le PAI-2 ait originellement été purifié à partir de tissus placentaires, il est aussi exprimé par les kératinocytes et les cellules tumorales (Tsatas, Baker et Rice, 1997). Bien que le PAI-2 inhibe les deux activateurs du plasminogène, ce dernier montre une rapidité d'inhibition supérieure envers l'uPA (Andreasen *et al.*, 1990).

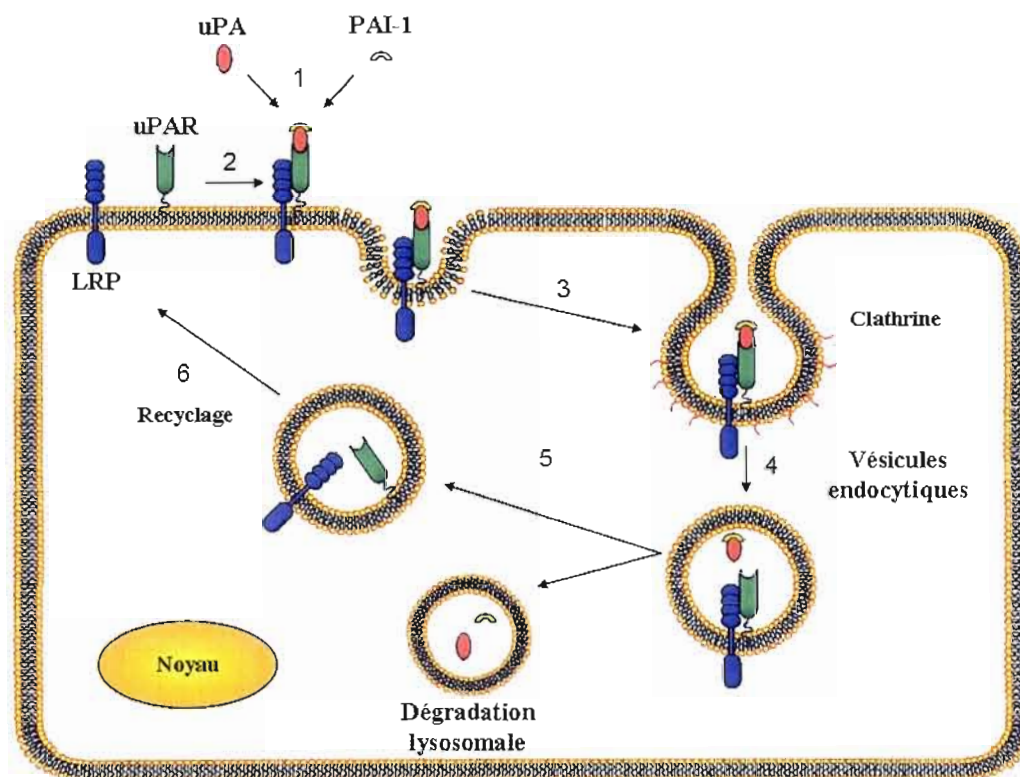
L' $\alpha_2$ -antiplasmine appartient également à la superfamille des serpins et constitue l'un des plus importants inhibiteurs de la plasmine (Wiman et Collen, 1978) (Figure 1.2). Cet inhibiteur forme un complexe avec la plasmine en s'associant aux domaines *kringles*, plus particulièrement au niveau des sites de liaison à la lysine. L' $\alpha_2$ -antiplasmine est un inhibiteur efficace et rapide de la plasmine libre présente dans la circulation sanguine ou dans le milieu extracellulaire. Cependant, l'activité de l' $\alpha_2$ -antiplasmine est considérablement réduite lorsque le plasminogène est associé à la membrane plasmique (Ponting, Marshall et Cederholm-Williams, 1992). L'importance de la composition des domaines *kringles* dans l'activation du plasminogène a aussi été mise en évidence grâce à l'acide  $\epsilon$ -amino-n-

caproïque (EACA). L'EACA est un analogue synthétique de lysine qui empêche spécifiquement la liaison du plasminogène à ses récepteurs ainsi que celle de la plasmine à ses substrats (Sun *et al.*, 2002; Perides *et al.*, 2006).

#### *1.1.1.4 Les récepteurs membranaires associés au système d'activation du plasminogène*

Les récepteurs membranaires constituent des éléments majeurs lors de la cascade d'activation du plasminogène. Plusieurs évidences montrent que l'activité protéolytique découlant de l'activation du plasminogène s'avère plus efficace lorsque celle-ci se produit à la surface cellulaire. En ce sens, l'uPAR et le *low-density lipoprotein receptor-related protein* (LRP) sont tous deux impliqués dans la cascade d'activation du plasminogène en surface. L'uPAR est une protéine hautement glycosylée (55-60 kDa) attachée à la membrane plasmique par une ancre glycosyl-phosphatidylinositol (GPI). Ce moyen d'ancrage procure une répartition rapide et facilite le recyclage du récepteur à la surface cellulaire (de Bock et Wang, 2004). La liaison de l'uPA à l'uPAR s'effectue au niveau du domaine homologue à l'EGF de l'activateur. Cette association accroît la vitesse d'activation du plasminogène, favorise une activité protéolytique localisée à la membrane et entraîne l'activation de la voie de signalisation intracellulaire des MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) (Nozaki *et al.*, 2006). Le site de liaison à la vitronectine que possède l'uPAR lui confère une forte association à la MEC et un rôle clé dans la motilité, l'adhérence et la migration cellulaire (Koolwijk *et al.*, 2001). D'ailleurs la surexpression de ce récepteur a été identifiée dans une variété de lignées cancéreuses et semble être corrélée à leur potentiel métastatique (Wang, Dentler et Borchardt, 2001). La liaison du PAI-1 à l'uPA déjà associé à son récepteur conduit à une régulation négative de la boucle d'activation pro-uPA/uPA/plasmine. Compte tenu que l'uPAR ne peut internaliser efficacement le complexe trimérique uPAR:uPA:PAI-1, la participation de LRP est essentielle (voir Figure 1.3). L'uPA et le PAI-1 se dissocient de l'uPAR dans les endosomes et sont dégradés par la voie lysosomale, tandis que les récepteurs libres sont recyclés à la membrane plasmique (Parfyonova, Plekhanova et Tkachuk, 2002).

Cependant, ce processus de recyclage n'étant pas optimal, une faible fraction du récepteur est catabolisée (Webb, Nguyen et Gonias, 2000).



**Figure 1.3** Internalisation et recyclage de l'uPAR à la surface cellulaire.

Sept étapes ont été caractérisées pour décrire l'internalisation et le recyclage du récepteur de l'urokinase. (1) L'uPA se lie à son récepteur l'uPAR afin d'activer la conversion du plasminogène. La liaison du PAI-1 à l'uPA permet de réguler ce processus via la formation d'un complexe PAI-1:uPA:uPAR. (2) L'internalisation de l'uPAR ne peut s'effectuer seule et nécessite la mobilisation de LRP. (3) Le complexe multimérique PAI-1:uPA:uPAR:LRP est internalisé via les régions spécialisées de la membrane plasmique dit puits de clathrine. (4) La fusion des vésicules aux endosomes induit la dissociation des ligands. (5) L'uPA et le PAI-1 sont alors éliminés par la voie lysosomale. (6) Les récepteurs LRP et uPAR sont ensuite recyclés à la membrane plasmique sous une forme libre et active. Tiré et modifié de (Li *et al.*, 2002).

La superfamille des récepteurs de lipoprotéines de faible densité (LDL-R) comprend jusqu'à maintenant six récepteurs dont LRP. Ces récepteurs ont en commun un domaine

transmembranaire, une courte portion cytoplasmique à l'extrémité C-terminale, et un domaine extracellulaire impliqué dans la liaison aux ligands (Moestrup *et al.*, 1993). LRP possède une large distribution tissulaire et son expression a été rapportée dans plusieurs tissus incluant le cerveau et le foie (Zheng *et al.*, 1994; Stockinger *et al.*, 1998). Le précurseur de 600 kDa est clivé par la furine au niveau du *trans*-Golgi afin de former un hétéro-dimère consistant en une chaîne  $\alpha$  de 515 kDa associée par un lien non covalent à la chaîne  $\beta$  de 85 kDa (Herz *et al.*, 1990). La sous-unité  $\alpha$  a pour fonction de lier les ligands dans le milieu extracellulaire, alors que la chaîne  $\beta$  comprend la région transmembranaire ainsi que la queue cytoplasmique (Willnow *et al.*, 1996). La structure conformationnelle de LRP est assurée par une protéine chaperonne associée au récepteur (RAP). RAP est présente au niveau du réticulum endoplasmique et évite la liaison précoce de ligands au récepteur.

En plus d'assurer le transport d'une multitude de ligands, LRP lie et médie l'internalisation des complexes protéases:inhibiteurs à la surface cellulaire, tel qu'illustré à la Figure 1.3. Des études ont démontré que LRP participait à l'internalisation des complexes tPA:PAI-1 (Orth *et al.*, 1992), uPA:PAI-1 (Nykjaer *et al.*, 1992) et uPA:uPAR:PAI-1 (Herz et Strickland, 2001). De plus, LRP peut lier et endocyter les formes libres de l'uPA et du tPA, suggérant ainsi un rôle important dans la régulation de l'activité protéolytique (Bu *et al.*, 1992; Kounnas *et al.*, 1993). Comme tous les membres de la famille des LDL-R, LRP est endocytée de manière constitutive dans les régions spécifiques de la membrane plasmique appelées puits de clathrine. La fusion des vésicules de clathrine aux endosomes induit la dissociation du ligand et permet le recyclage du récepteur à la surface.

#### *1.1.1.5 Implication du système d'activation du plasminogène dans la progression tumorale*

Le système d'activation du plasminogène participe de manière substantielle au développement physiologique normal. Les souris déficientes pour les gènes du plasminogène ou de ses activateurs développent des thromboses sévères et excessives (Carmeliet *et al.*, 1994; Bugge *et al.*, 1995). En ce sens, l'activation du plasminogène par le tPA joue un rôle majeur dans la dissolution de caillots sanguins à travers le système circulatoire (Stubbs, Renatus et Bode, 1998). Bien que l'uPA soit principalement associé à la protéolyse extracellulaire, ce dernier participerait à la fibrinolyse extravasculaire (Idell, 2002). La connection entre le système fibrinolytique et le cancer a été établie il y a plusieurs années, par la démonstration que les cellules cancéreuses pouvaient dissoudre les caillots de manière continue par un mécanisme de digestion protéolytique (Pollanen, Stephens et Vaheri, 1991). La plasmine facilite l'invasion des cellules cancéreuses à travers la membrane basale et les tissus conjonctifs, favorisant ainsi la progression tumorale. Par ailleurs, l'activation de pro-MMP et de certains facteurs de croissance - tels que le TGF- $\beta$  et le FGF (Lyons *et al.*, 1990;



Saksela et Rifkin, 1990) - par la plasmine, contribue à la dégradation excessive de la MEC et au développement angiogénique.

Plusieurs études ont démontré que la participation du système d'activation du plasminogène favorisait la progression tumorale. L'association de l'uPA à son récepteur représente une étape essentielle et nécessaire à l'invasion des cellules tumorales aux tissus adjacents lors du développement métastatique (Ossowski *et al.*, 1991; Kook *et al.*, 1994). Des essais de migration cellulaire *in vitro* ont démontré que l'expression du plasminogène, de l'uPA, de l'uPAR et du PAI-1 était stimulée. Ces études révèlent également que l'uPA et l'uPAR étaient majoritairement localisés aux pointes cellulaires responsables de l'extension des cellules migratoires (Pepper *et al.*, 1993; Okada, Tomaszewski et Barnathan, 1995; Duffy, 2002). L'expression simultanée d'uPA, d'uPAR et de PAI-1 par des cellules cancéreuses est également corrélée à une invasion massive d'une matrice de Matrigel (Liu, Shuman et Cohen, 1995). De manière générale, des niveaux importants d'uPA, d'uPAR et de PAI-1 sont associés à un mauvais pronostic pour plusieurs types de cancers (Ossowski et Belin, 1985; Schmitt *et al.*, 1997). L'implication du système d'activation du plasminogène dans la progression de plusieurs types de cancers solides, dont le cancer du sein, de l'ovaire, du poumon et du cerveau, en fait une cible prometteuse pour le développement de nouvelles thérapies.

### ***1.1.2 Le rôle des métalloprotéases matricielles***

La dégradation et le remodelage de la MEC nécessite l'action d'enzymes protéolytiques tels que les MMP. Ces protéases représentent une large famille dont la classification, principalement basée sur leur spécificité de substrat, comporte cinq grandes catégories : les collagénases, les gélatinases, les stromélysines, les matrilysines et les MMP de type membranaire (MT-MMP) (Visse et Nagase, 2003). La forme native des MMP est constituée d'un pro-domaine, d'un domaine catalytique et d'un domaine hautement conservé renfermant le site actif essentiel à l'activité enzymatique. La génération de l'enzyme active requiert le clivage du pro-domaine par protéolyse (Polette *et al.*, 2004). En conditions physiologiques, l'activité des MMP est indispensable pour assurer le développement

embryonnaire, la cicatrisation, l'ovulation et le remodelage tissulaire (Vu et Werb, 2000). Cependant, leur surexpression induit une dégradation excessive de la MEC et est associée à diverses conditions pathologiques telles que l'arthrite rhumatoïde, l'ulcération gastrique, l'athérosclérose et la formation de métastases (Westermarck et Kahari, 1999). La régulation des fonctions des MMP s'effectue à plusieurs niveaux. D'une part, l'expression de leur ARN messager est traduit sous une forme latente dite pro-MMP. D'autre part, l'enzyme active est régulée de manière spécifique par les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases (TIMP) (Yoon *et al.*, 2003).

Parmi les collagénases de type IV, la gélatinase A (MMP-2; 62 kDa) et la gélatinase B (MMP-9; 67 kDa) sont fréquemment associées à la progression tumorale. Ces enzymes possèdent un domaine de liaison à la gélatine similaire à la fibronectine ayant la capacité de lier également le collagène et la laminine (Allan *et al.*, 1995). Les MMP-2 et -9 dégradent préférentiellement le collagène dénaturé ainsi que les composantes de la membrane basale comme la fibronectine, l'élastine et les protéoglycans (Aimes et Quigley, 1995; Patterson *et al.*, 2001). Bien que la MMP-2 soit exprimée constitutivement par plusieurs types cellulaires, la MMP-9 est principalement sécrétée suite à une stimulation par divers agents stimulant le remodelage tissulaire, comme les facteurs de croissance et les cytokines (Polette *et al.*, 2004). En ce sens, la MMP-9 peut être synthétisée par les cellules tumorales, les monocytes, les neutrophiles et les macrophages. Suite à sa sécrétion, la pro-MMP-2 forme un complexe avec TIMP-2 et se lie à la MT1-MMP localisée à la membrane plasmique afin de générer l'enzyme sous sa forme active. L'activation de la pro-MMP-9 diffère puisque la pro-enzyme est activée par la cathepsine G, la trypsine et la stromelysine-1 sans que le complexe pro-MMP-9:TIMP-1 soit nécessaire (Goldberg *et al.*, 1992; Gomez *et al.*, 1997).

Un déséquilibre entre les niveaux de TIMP et de MMP sécrétés induit une dégradation excessive de la MEC comme lors de la croissance tumorale et de la formation de métastases. De nombreuses études démontrent une corrélation positive entre l'expression des MMP et le comportement métastatique des tumeurs provenant de la peau, du cerveau (Matsuzawa *et al.*, 1996), du sein (Clavel *et al.*, 1992), de la prostate (Stearns, Wang et Fudge, 1993), du côlon (Poulsom *et al.*, 1992), du poumon (Urbanski *et al.*, 1992) et de

l'ovaire (Campo *et al.*, 1992). Lorsqu'une tumeur devient vascularisée, MMP-2 et MMP-9 jouent un rôle crucial en activant la balance pro-angiogénique. En outre, le VEGF et le bFGF stimulent l'expression de MMP-2, de MMP-9 et de MT1-MMP au sein des cellules inflammatoires infiltrantes, de même qu'au niveau des cellules endothéliales (CE) et tumorales (Mohan *et al.*, 2000; Rundhaug, 2005).

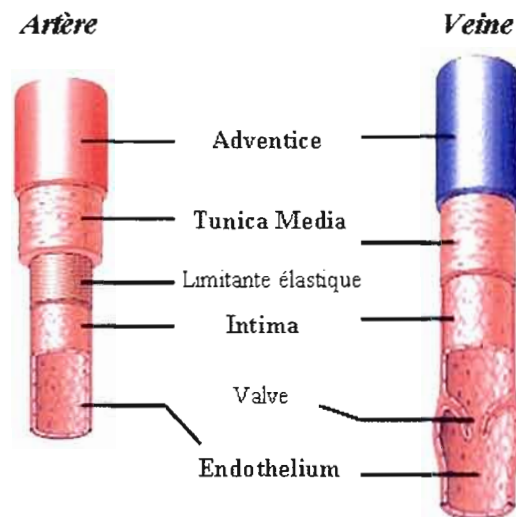
## 1.2 Les mécanismes associés à l'angiogenèse

Le système cardiovasculaire est le premier système fonctionnel lors du développement embryonnaire chez les vertébrés. La croissance et la différenciation embryonnaires sont dépendantes du transport des nutriments et des déchets via cette jeune vascularisation. Chez l'adulte, le réseau vasculaire sert de système de communication entre les organes et les tissus. On distingue deux grandes étapes à la formation des vaisseaux sanguins : la vasculogénèse et l'angiogenèse. Le terme vasculogénèse réfère à la formation de vaisseaux sanguins à partir de précurseurs endothéliaux au stade embryonnaire (Risau et Flamme, 1995), tandis que l'angiogenèse décrit la formation de nouveaux vaisseaux sanguins par bourgeonnement d'un vaisseau préexistant (Folkman et Shing, 1992). Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) est l'un des modulateurs les plus importants impliqués dans ces deux processus. Au stade embryonnaire, le processus angiogénique est très actif, alors que chez l'adulte la vascularisation est plutôt quiescente. En fait, l'angiogenèse est requise principalement lors de la réparation tissulaire et du processus inflammatoire, ainsi qu'au niveau du système reproducteur féminin (Folkman, 1995a). Cependant, un développement angiogénique excessif peut mener à l'apparition de pathologies telles que l'arthrite rhumatoïde, la rétinopathie, l'Alzheimer, le psoriasis et le cancer (Folkman, 1995a; Carmeliet, 2005). La formation de nouveaux vaisseaux sanguins fournit un apport en oxygène et en nutriments à la tumeur croissante. En l'absence de support vasculaire, la taille d'une tumeur au sein d'un tissu ne peut dépasser 2 à 3 mm<sup>3</sup> (Folkman, 1995b; Carmeliet et Jain, 2000). Les cellules tumorales sécrètent alors des cytokines et des facteurs de croissance afin de stimuler la formation de nouveaux vaisseaux sanguins vers la tumeur (Folkman, 1995a). Aussi, dès l'acquisition du processus angiogénique, la tumeur marque une croissance plus rapide et une invasion locale pouvant favoriser la dissémination

métastatique.

### **1.2.1 Structure du réseau vasculaire**

Les parois des veines et des artères sont composées de trois tuniques entourant la lumière des vaisseaux. La couche externe, nommée adventice, est constituée de tissu conjonctif contenant en grande partie des fibres de collagène et quelques cellules musculaires lisses. La tunique moyenne (*tunica media*) est quant à elle principalement composée de cellules musculaires lisses et de fibres élastiques. Cette couche est très développée au niveau artériel, mais elle devient indistincte dans les veines et pratiquement inexistante dans les petits vaisseaux comme les capillaires. La tunique interne, aussi appelée *intima*, est constituée d'un endothélium tapissant la lumière de tous les vaisseaux sanguins. L'arrangement des CE en une surface lisse représente beaucoup plus qu'une simple barrière avec le sang. Cette tunique a la capacité de libérer des substances vasoactives agissant sur les muscles lisses vasculaires, telles que l'endothéline et le monoxyde d'azote (Moncada *et al.*, 1976; La et Reid, 1995). Ainsi, les CE sont intimement impliquées dans l'homéostasie vasculaire. La Figure 1.4 illustre les différentes couches constituant les vaisseaux sanguins de plus grosses tailles.

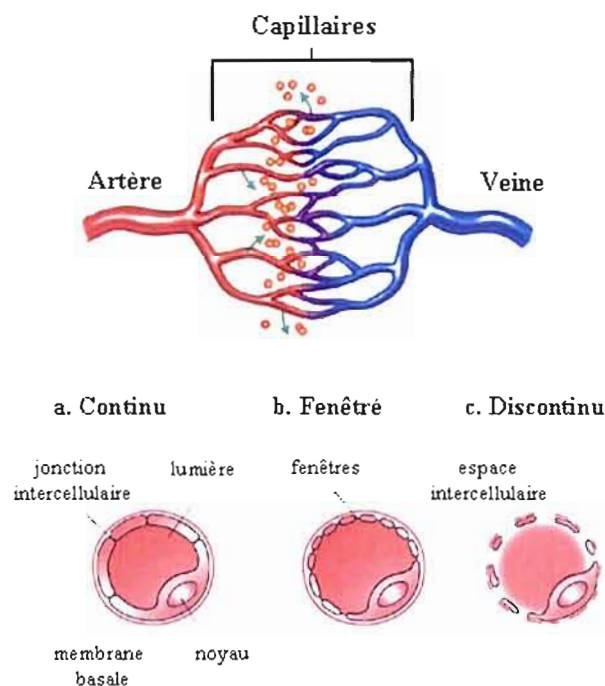


**Figure 1.4** Morphologie des vaisseaux sanguins du système vasculaire.

La composition des parois des veines et des artères présente une certaine homogénéité. Les vaisseaux plus larges possèdent plusieurs couches de différents types cellulaires et composants extracellulaires. Les veines et les artères sont constituées de la tunica intima (cellules endothéliales et membrane basale), d'une tunica media (cellules musculaires lisses et collagène, élastine, protéoglycans) et de l'adventice (tissus conjonctif, fibres de collagène et élastiques). Les veines possèdent des valves afin de prévenir le retour sanguin, tandis que les artères présentent une élasticité supplémentaire pour résister à une pression sanguine élevée. Tiré de Cleaver (Cleaver et Melton, 2003).

Les capillaires sont les plus petits vaisseaux sanguins avec un diamètre de 8 à 10  $\mu\text{m}$ . Leur paroi très mince n'est formée que de CE reposant sur la membrane basale. Il existe deux types de capillaires sanguins : les capillaires continus et les capillaires fenêtrés (Figure 1.5). L'endothélium des capillaires continus forme un revêtement ininterrompu grâce aux jonctions serrées (Campbell et Mathieu, 1995). Ces capillaires jouent un rôle important dans la protection du cerveau, mais aussi au niveau du coeur et des poumons (Cleaver et Melton, 2003). Pour leur part, les capillaires fenêtrés présentent un avantage pour les organes ayant un rôle d'absorption ou de filtration comme l'intestin grêle, le glomérule rénal et les glandes endocrines. Les capillaires sinusoidaux possèdent une membrane basale particulièrement discontinuée et parfois quasi-absente. Cette structure favorise les échanges de métabolites et

l'élimination des toxines. Les capillaires se regroupent en réseaux appelés lits capillaires et relient le système artériel au système veineux (Spence et Mason, 1983).



**Figure 1.5** Structures des capillaires sanguins.

L'illustration supérieure montre la connection entre le système artériel (en rouge) et le réseau veineux (en bleu) par les capillaires sanguins. Les échanges de nutriments et d'oxygène s'effectuent principalement au niveau des lits capillaires. L'illustration inférieure représente les différents types de capillaires. (a) Les capillaires continus ne possèdent aucune ouverture intercellulaire et sont principalement localisés au niveau des muscles squelettiques, du cœur, du poumon et du cerveau. (b) Les capillaires fenêtrés présentent de petites ouvertures de 80-100 nm de diamètre. Les fenêtres permettent la diffusion rapide des macromolécules notamment au niveau intestinal. (c) Les capillaires discontinus, aussi dits sinusoides, possèdent une lumière plus grande. Ces capillaires ne présentent aucune fenêtré et ont une membrane basale discontinuée ou absente. Ils bordent les sinusoides hépatiques où ils favorisent les échanges de métabolites et l'élimination des toxines. Illustration modifiée de (Cleaver et Melton, 2003).

La majorité des CE formant les capillaires sont impliquées dans plusieurs fonctions métaboliques, dont l'aggrégation plaquettaire, la fibrinolyse, l'adhérence et la migration des leucocytes, la régulation du remodelage des parois cellulaires ainsi que l'angiogenèse (Pearson, 1991). Plusieurs études rapportent que l'endothélium tumoral présente plusieurs anomalies au niveau de sa morphologie (Bergers et Benjamin, 2003). En effet, l'exposition des CE aux facteurs angiogéniques produits par la tumeur limite la différenciation de l'endothélium vasculaire et les vaisseaux tumoraux possèdent une perméabilité accrue (Tosetti *et al.*, 2002).

### ***1.2.2 Principe de l'angiogenèse tumorale***

L'acquisition du phénotype angiogénique par une tumeur résulte d'une rupture de l'équilibre local entre inducteurs et inhibiteurs de l'angiogenèse. L'influence du VEGF dans le bourgeonnement de vaisseaux sanguins est connue et bien caractérisée. Cependant, son action requiert la participation de plusieurs facteurs. La réponse angiogénique est initiée par la sécrétion de divers facteurs pro-angiogéniques par les cellules tumorales. Parmi ceux-ci, le bFGF, le VEGF, l'interleukine-8, le TGF- $\beta$  et l'uPA recrutent les CE. La liaison des facteurs pro-angiogéniques à la surface des cellules endothéliales vasculaires active une cascade de signalisation intracellulaire et initie le processus de dédifférenciation endothéliale. Lors de la phase initiale de l'angiogenèse, les vaisseaux sanguins présentent une dilatation accrue et leurs CE démontrent des signes d'activation. L'activation des CE peut se présenter par une augmentation des organelles cytoplasmiques et une réduction des jonctions intercellulaires. Il en résulte une perte d'adhérence des CE à la membrane basale, de même qu'une augmentation de la perméabilité pericellulaire (Conway, Collen et Carmeliet, 2001). Les protéases sécrétées par les CE activées (MMP et protéases à sérine, à cystéine et à acide aspartique) agissent conjointement avec celles produites par les cellules tumorales afin de dégrader les composantes de la membrane basale et de la MEC. Cet important remodelage tissulaire facilite ainsi la migration et la prolifération des CE. La migration cellulaire implique l'extension de la cellule et son adhésion à la MEC. La liaison de molécules d'adhérence (intégrines et sélectines) à leurs substrats présents dans la MEC assure la traction nécessaire pour le mouvement cellulaire (Conway, Collen et Carmeliet, 2001). Par la suite,

les CE ayant atteint le nid tumoral se différencient en structure tubulaire en vue de former la lumière vasculaire. Lors du processus angiogénique, les molécules d'adhésion des CE telles que l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  et la molécule d'adhésion vasculaire-1 facilite la connection des néovaisseaux aux vaisseaux existants (Koch *et al.*, 1995; Eliceiri *et al.*, 1999). La connection des nouveaux bourgeons capillaires à la circulation sanguine existante complète la globalité du processus angiogénique. La maturation de la paroi vasculaire implique le recrutement des péricytes et des cellules musculaires lisses, le développement de la MEC de même que la spécialisation des CE (Wang, Chen et Anderson, 1998; Hellstrom *et al.*, 1999). La production de facteurs de croissance, tels que le bFGF, l'IGH et le PDGF, par les cellules stromales et/ou endothéliales des capillaires néoformés aura un effet stimulateur additionnel sur la croissance des cellules tumorales (Folkman, 1995b).

L'hypoxie est un stimulus important pour l'expansion vasculaire, puisqu'elle régule l'expression du facteur de transcription HIF-1. Ce dernier induit l'expression de gènes dits angiogéniques, dont ceux du VEGF et de ses récepteurs (Hoeben *et al.*, 2004). Le TNF- $\alpha$  est une cytokine inflammatoire ayant un rôle indirect dans l'angiogenèse. Ce dernier promeut la sécrétion de molécules angiogéniques (bFGF, PAF et VEGF) et la régulation positive des composantes du système plasminolytique (Hoeben *et al.*, 2004). La sécrétion du VEGF-A est également stimulée par le TGF- $\beta$ , le PDGF, l'IGF et l'EGF (Enholm *et al.*, 1997; Akagi *et al.*, 1998). Des données sur les cancers dits hormonaux, dont les cancers du sein et de la prostate, ont démontré que l'œstrogène et la testostérone stimulaient également la transcription du gène codant pour le VEGF-A et stabilisaient le transcrit (Shweiki *et al.*, 1993; Ruohola *et al.*, 1999). Parmi les inhibiteurs endogènes de l'angiogenèse, certains dérivent de la matrice tels que l'endostatine et les thrombospondines, alors que d'autres proviennent du milieu extracellulaire comme l'angiostatine et les TIMP (revue par (Nyberg, Xie et Kalluri, 2005)). Les produits du gène p53 promeuvent l'expression des inhibiteurs de l'angiogenèse (thrombospondine) et inhibent l'expression du VEGF-A (Ravi *et al.*, 2000). Par ailleurs, le gène p53 est muté dans plus de 50 % de tous les types de cancers (Yuan *et al.*, 2002).



### 1.2.3 Les principaux joueurs impliqués dans l'angiogenèse tumorale

La famille du VEGF compte sept membres, parmi lesquels le VEGF-A demeure celui qui est le plus souvent associé au développement angiogénique tumoral (Ferrara et Davis-Smyth, 1997; Ferrara, 1999). Le VEGF-A est une glycoprotéine dimérique de 42 kDa exprimée normalement au niveau des poumons, des reins, du cœur et de la glande surrénale. Plusieurs isoformes du VEGF-A humain ont été décrites en fonction de leur nombre en acides aminés, soit les VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>165</sub> (où l'isoforme 165 étant la forme majoritaire du VEGF-A), ainsi que les isoformes 189 et 206 qui sont séquestrées dans la MEC sous la forme de réserve (Tischer *et al.*, 1991; Poltorak *et al.*, 1997). Le VEGF peut être synthétisé par les cellules tumorales et par les cellules stromales associées à la tumeur (Fukumura *et al.*, 1998). La réponse effectrice du VEGF se traduit par une stimulation de la migration et la prolifération des CE, ainsi que par l'augmentation de la perméabilité vasculaire (Senger *et al.*, 1983; Ferrara et Henzel, 1989). Bien que le VEGF soit considéré comme étant un joueur clé de l'angiogenèse tumorale, sa quantification au sein des tumeurs représente un mauvais indicateur de pronostic (Hoebe *et al.*, 2004).

Le VEGF agit par l'intermédiaire de ses récepteurs présents à la surface de ces CE (Neufeld *et al.*, 1999). Les VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR/Flk-1) et VEGFR-3 (Flt-4) sont des récepteurs de type tyrosine-kinase et possèdent une homologie structurale élevée entre eux. La structure des récepteurs du VEGF est divisée en 4 régions, soit un domaine de liaison du ligand extracellulaire, un domaine transmembranaire, un domaine de kinase à tyrosine et une région carboxyle terminale cytoplasmique (Ferrara, Gerber et LeCouter, 2003). La liaison du VEGF à ses récepteurs entraîne la dimérisation de ceux-ci, stimule l'activité kinasique et provoque leur autophosphorylation. Les récepteurs phosphorylés peuvent induire l'activation de diverses voies de signalisation impliquant le recrutement de seconds messagers. Pour sa part, la liaison du VEGF-A s'effectue au niveau du domaine extracellulaire des VEGFR-1 et -2. Ces derniers sont exprimés à la surface des CE vasculaires et lymphatiques. Le VEGFR-2 est responsable de la majorité des effets biologiques du VEGF au niveau de l'endothélium vasculaire. On compte parmi ceux-ci la prolifération cellulaire, la migration et la survie des CE. Suite à sa stimulation par le VEGF-

A, le VEGFR-2 est autophosphorylé au niveau du domaine de kinase à tyrosine à son extrémité carboxyle; s'en suit l'activation d'une cascade de signalisation intracellulaire impliquant la protéine kinase C et la protéine kinase activée par les mitogènes (MAP-kinase) (Takahashi *et al.*, 2001). L'activation du VEGFR-2 entraîne également l'activation des petites Rho GTPases, telles que RhoA et CDC42 (Lamallice *et al.*, 2004). On a démontré à maintes reprises que le VEGFR-2 jouait un rôle important dans l'angiogenèse tumorale. Bien que le VEGFR-1 possède une affinité supérieure pour le VEGF-A que le VEGFR-2, l'activité associée à son domaine de protéine kinase à tyrosine est relativement faible. Outre son rôle dans l'activation des macrophages et la croissance tumorale, la signalisation en amont de l'activation du VEGFR-1 demeure peu connue. Pour sa part, l'activation du VEGFR-3 par la liaison du VEGF-C ou -D est notamment impliquée dans l'angiogenèse embryonnaire ainsi que dans la lymphangiogenèse (Shibuya, 2006). Des études ont rapporté que des versions solubles des VEGFR-1 et -2 possédaient des effets anti-angiogéniques en séquestrant le VEGF (Kendall et Thomas, 1993; Kendall, Wang et Thomas, 1996; Conway, Collen et Carmeliet, 2001). Chez l'humain, la concentration du VEGF circulant atteint en moyenne 75 pg/mL, tandis que celle du Flt-1 soluble est d'environ 23 pg/mL (Belgore, Blann et Lip, 2000). Ainsi, le VEGF circulant peut se trouver sous une forme libre active ou liée inactive, selon les niveaux de ses récepteurs solubles (Yoshimura *et al.*, 2004).

#### ***1.2.4 La migration des cellules endothéliales***

La migration des CE dans un contexte angiogénique résulte de trois mécanismes appelés la chimiotaxie, l'haptotaxie et la mécanotaxie (Li, Huang et Hsu, 2005). Les trois promoteurs principaux de la chimiotaxie des CE sont le VEGF, le bFGF et les angiopoïétines. Cependant plusieurs autres cytokines participent à la stimulation de ce processus. La chimiotaxie des CE lors du développement angiogénique découle principalement de la stimulation du VEGFR-2 par le VEGF-A. L'haptotaxie définit la migration cellulaire médiée par la liaison aux composantes de la MEC et ce, de manière indépendante des cytokines (Klemke *et al.*, 1997; Davis et Senger, 2005). En l'absence de stimulus angiogénique, la MEC contribue au maintien des CE en état de quiescence. Toutefois, la digestion de la MEC par les protéases pro-angiogéniques libère des fragments initiant les signaux pro-migratoires

(Wang, Anderson et Gladson, 2005). Les interactions des CE avec la MEC consolident les mouvements cellulaires par des points d'adhésion focaux entre la membrane plasmique et la MEC, de même qu'entre la membrane plasmique et le cytosquelette. Cet assemblage nécessite le recrutement des molécules de signalisation, telles que FAK et paxilline, ainsi que les molécules structurales comme la vinculine, la taline et la tensine (Huot *et al.*, 1998; Romer, Birukov et Garcia, 2006). De plus, la participation des intégrines dans l'haptotaxie des CE favorise leur adhésion à la MEC (Klemke *et al.*, 1997; Giancotti, 2000). Du fait que les CE bordent la lumière des vaisseaux, elles sont continuellement exposées à la friction créée par le débit sanguin. Cette force mécanique, ou mécanotaxie, oriente la migration des CE en conditions angiogéniques de même que la formation de lamellipodes (Li, Huang et Hsu, 2005). La mécanotaxie requiert l'activation des petites Rho-GTPases par le biais de l'élongation des micro-tubules, l'activation de Rac et la polymérisation de l'actine. L'association des CE à la MEC est essentielle à leur survie et au développement angiogénique. La rupture précoce des complexes focaux d'adhésion entraîne systématiquement la mort des CE par anoïkis. L'anoïkis présente les principales caractéristiques de l'apoptose, dont la fragmentation nucléaire et l'activation des caspases (Reddig et Juliano, 2005).

### 1.2.5 Les stratégies anti-angiogéniques

Depuis les travaux de Folkman en 1971 (Folkman *et al.*, 1971), il a été établi que l'angiogenèse était indispensable à la croissance des tumeurs solides et à la dissémination métastatique. Dès l'acquisition du phénotype angiogénique, la tumeur se développe avec une croissance quasi exponentielle qui va dépendre de l'importance du réseau vasculaire. Par conséquent, plusieurs approches thérapeutiques tumorales ciblent le développement angiogénique. Les traitements anti-angiogéniques ne visent pas la destruction des cellules cancéreuses, mais ont pour but d'empêcher la division des CE et de maintenir un état de quiescence vasculaire. De nombreuses molécules anti-angiogéniques sont actuellement en cours d'évaluation pour le traitement des tumeurs solides. Les composés anti-angiogéniques peuvent agir à différents niveaux. Les interférons  $\alpha$  et  $\beta$  inhibent essentiellement la synthèse des facteurs angiogéniques par les cellules tumorales (Singh *et al.*, 1995). Les molécules anti-

angiogéniques peuvent également cibler le signal angiogénique intracellulaire ainsi que l'interaction entre les CE et la MEC. Toutefois, la majorité des stratégies anti-angiogéniques interfèrent avec la liaison des facteurs angiogéniques à leur récepteurs. À cet effet, l'utilisation d'anticorps anti-VEGF ou anti-bFGF a démontré une efficacité contre la progression tumorale (Hori *et al.*, 1991; Kim *et al.*, 1993; Presta *et al.*, 1997). L'anticorps humanisé dirigé contre le VEGF, plus connu sous le nom de bevacizumab (Avastin, Genentech Inc.), a été le premier anticorps anti-angiogénique commercialisé et approuvé par la *Food and Drug Administration* (FDA). Plusieurs molécules en développement dirigent également leur action sur les récepteurs du VEGF. Parmi celles-ci, le vatalanib (PTK787) et le SU11248 (approuvés par la FDA) ciblent l'activité tyrosine-kinase des VEGFR-1 et VEGFR-2 (Mendel *et al.*, 2003; Thomas *et al.*, 2003). Bien que ces approches anti-angiogéniques réduisent la vascularisation des tumeurs, elles ont peu d'effet sur la survie des patients atteints de cancer (Cobleigh *et al.*, 2003; Yang, 2004). Cependant, la combinaison d'agents anti-angiogéniques aux thérapies conventionnelles de chimiothérapie et de radiothérapie prolonge la survie de manière significative (Hurwitz *et al.*, 2004). Paradoxalement, plusieurs données rapportent que les agents anti-angiogéniques et la radiation peuvent compromettre l'acheminement des agents de chimiothérapie à la tumeur (Ma *et al.*, 2001).

### 1.3 Le développement métastatique

La dissémination cancéreuse est caractérisée par le développement d'une tumeur secondaire à distance de la tumeur initiale. Le développement métastatique requiert la réalisation de plusieurs étapes complexes et séquentielles par la cellule tumorale. Les cellules néoplasiques sont libérées de la tumeur primaire par la rupture de molécules d'adhésion cellulaire. Habituellement, les cellules ayant perdu plusieurs foyers d'adhérence focaux entrent habituellement en apoptose. Or, les cellules tumorales détournent le signal d'anoïkis et poursuivent le processus invasif. S'en suit la protéolyse de la MEC et la migration des cellules cancéreuses vers les vaisseaux lymphatiques et/ou sanguins (voir Figure 1.6). Le système lymphatique demeure la voie de dissémination cancéreuse la plus fréquemment employée par les cellules tumorales. Elle est responsable de la formation des métastases

ganglionnaires et concerne particulièrement les cancers lymphophiles (mélanomes et carcinomes du sein, du testicule et du col utérin). La voie hématogène constitue la seconde voie de propagation des cancers vers les poumons, le foie, le cerveau et les os. Certaines études ont démontré que seule une très faible fraction des cellules cancéreuses circulantes (0,01%) produisait efficacement des métastases. Effectivement, la majorité des cellules cancéreuses sont détruites par le système immunitaire (lymphocytes *Natural Killer*) et/ou le stress mécanique du débit sanguin (Fidler, 2002). En ce sens, le ralentissement du flux sanguin dans les capillaires facilite l'adhérence des cellules tumorales à l'endothélium. Certaines études rapportent que les cellules tumorales ont plus de facilité à accomplir certaines étapes du développement métastatique, dont l'intravasation dans la circulation sanguine, l'arrêt dans le lit capillaire et l'extravasation. Par contre, la croissance des micro-métastases et leur vascularisation s'avère être une tâche plus ardue (Cameron *et al.*, 2000; Naumov *et al.*, 2002).

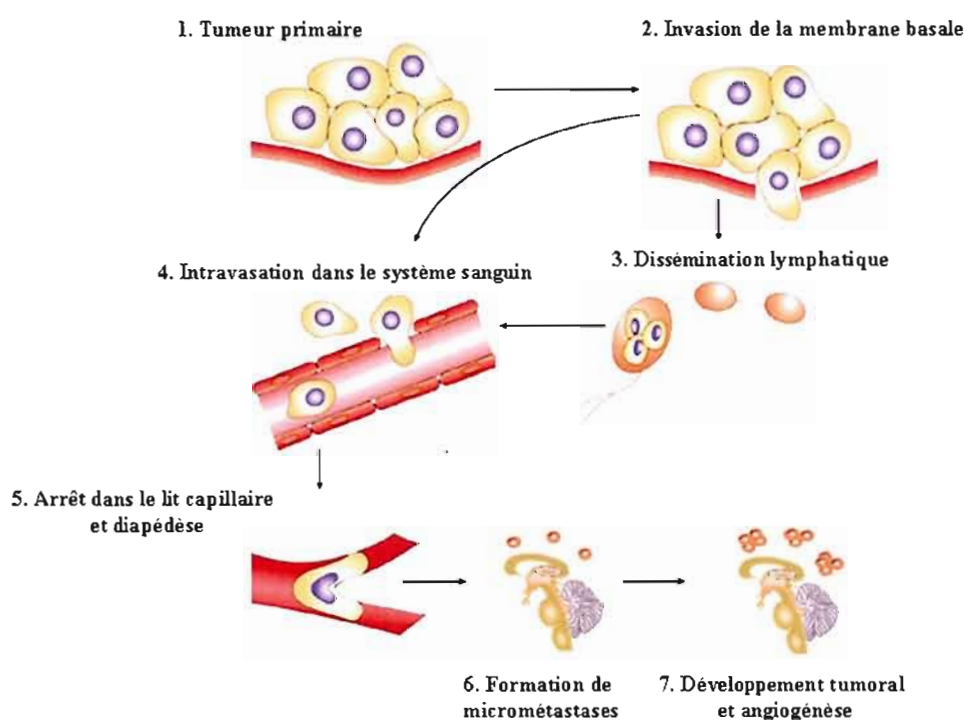
L'adhésion des cellules tumorales à l'endothélium vasculaire peut autant résulter d'interactions non-spécifiques par aggrégation plaquettaire, que de spécificité tissulaire (hypothèse de *seed and soil*). La spécificité de la dissémination métastatique est en partie associée à l'expression des sélectines (Gout, Tremblay et Huot, 2008). Cette famille regroupe trois récepteurs d'adhésion : les L-, P-, et E-sélectines. La L-sélectine est exprimée de manière constitutive par les lymphocytes, tandis que la E-sélectine est exprimée exclusivement par les CE en processus d'inflammation. La P-sélectine est retrouvée au niveau des plaquettes et des CE. Les sélectines sont principalement impliquées dans l'adhésion des leucocytes à l'endothélium vasculaire (Bird *et al.*, 1997). Cependant, plusieurs évidences indiquent que les cellules cancéreuses interagissent avec les sélectines afin d'atteindre les tissus cibles. À cet effet, la E-sélectine est fortement associée à la dissémination métastatique en favorisant l'adhésion des cellules tumorales aux CE (Brodt *et al.*, 1997; Witz, 2006). La E-sélectine participe à l'adhésion initiale des cellules tumorales, à leur roulement sur l'endothélium vasculaire, puis à leur diapédèse via l'activation de ERK (Tremblay, Auger et Huot, 2006). Le tableau 1 détaille les sites métastatiques préférentiels de divers types de tumeurs primaires.

**Tableau 1.1** Dissémination métastatique par la sélectivité des organes hôtes. Tableau tiré de (Gout, Tremblay et Huot, 2008).

Origine des tumeurs primaires	Sites préférentiel des métastases
Côlon, rectum, estomac	Foie, poumon
Sein	Os, foie, poumon, cerveau, glande surrénale
Poumon ( <i>small cells</i> )	Cerveau, foie, moëlle épinière
Poumon ( <i>non small cells</i> )	Foie, os, cerveau
Prostate	Os, poumon
Rein	Poumon, os, glande surrénale
Mélanome	Foie, cerveau, côlon
Neuroblastome	Foie, glande surrénale

La dissémination cancéreuse régie par les voies de drainage veineux (théorie d'organe filtre) expliquerait que le drainage des organes par la veine porte favorise la production de métastases hépatiques; un drainage par les veines caves, les métastases pulmonaires; puis un drainage par la veine pulmonaire, les métastases systémiques (cerveau et os) (Fidler, 2003). Il est évident que les cellules cancéreuses empruntant la voie sanguine peuvent se disséminer dans l'organisme avant d'atteindre leur cible. Néanmoins, les quatre sites majeurs des atteintes métastatiques demeurent les os, le foie, les poumons et le cerveau.

Les métastases cérébrales représentent une cause importante de morbidité et comptent parmi les tumeurs intracrâniennes les plus communes chez les adultes ; sachant que 80% des cas de métastases cérébrales sont découverts après le décès des personnes atteintes de cancer (Wen et Loeffler, 2001). Le risque de développer des métastases cérébrales dépend essentiellement du type de tumeur primaire. En ce sens, les mélanomes et les cancers d'origine colorectale, pulmonaire et mammaire présentent une capacité accrue à générer des tumeurs secondaires au cerveau (voir le tableau 1).



**Figure 1.6** Le développement métastatique.

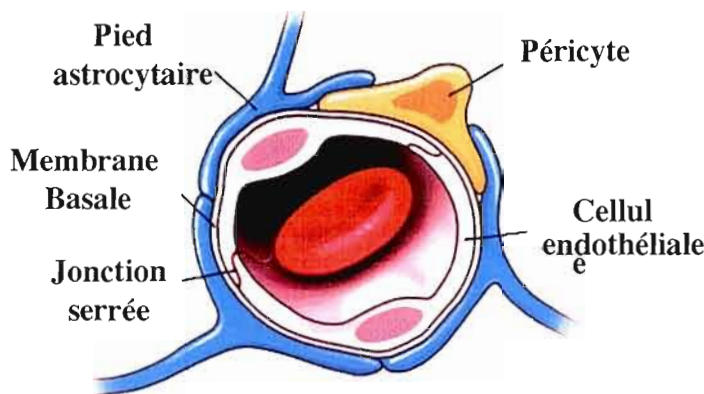
Représentation schématique de la formation de métastases à partir d'une tumeur primaire (1) bordée d'une membrane basale intacte. (2) L'invasion tumorale s'effectue par la dégradation de la MEC et de la membrane basale. La dissémination métastatique s'effectue soit par le système lymphatique (3) ou directement par la circulation sanguine (4). (5) Les cellules cancéreuses ayant survécu au débit sanguin et à la reconnaissance immunitaire s'arrêtent dans un lit capillaire distant et adhèrent à l'endothélium vasculaire. (6) La colonisation de l'organe est alors entamée suite à l'extravasation des cellules tumorales et à la formation de micrométastases. (7) Les métastases peuvent demeurer latentes ou progresser en macrométastases par stimulation de l'angiogenèse. Illustration tirée et modifiée de (Steeg, 2003).



### 1.3.1 Particularités des métastases cérébrales

Le cerveau est un organe hautement vascularisé et les cellules cancéreuses doivent franchir l'endothélium constituant la barrière hémato-encéphalique (BHE) afin d'atteindre le système nerveux central. Chez l'humain, la longueur des capillaires cérébraux formant la BHE est estimée à 650 km (Dohrmann, 1970). À la différence des autres organes, les CE des capillaires cérébraux sont soudées entre elles par des jonctions serrées, rendant la BHE imperméable à plusieurs substances véhiculées par le sang. De plus, les capillaires cérébraux ne sont pas fenêtrés et possèdent très peu de vésicules d'endocytose. Les CE de capillaires cérébraux sont entourées d'une MEC constituée notamment de pieds astrocytaires et de péricytes (Weil *et al.*, 2005), tel qu'illustré à la Figure 1.7. L'association étroite des CE avec la membrane basale et les astrocytes est importante pour le développement et le maintien de l'intégrité de la BHE (Aschner, 1998). La membrane basale, composée de collagène IV, de laminine et de fibronectine, sert de support aux CE. Les astrocytes, quant à eux, sont impliqués dans l'acquisition des jonctions serrées et sécrètent des facteurs solubles nécessaires à l'établissement des propriétés de la BHE (Ramsdohr et Fritz, 1998). Il a été démontré que la BHE environnant les métastases de moins de 0,1 mm<sup>2</sup> demeurait intacte, mais présentait une perméabilité accrue lorsque la taille des micro-tumeurs dépassait 0,2 mm<sup>2</sup> (Fidler, 2002). Ces données suggèrent que la perméabilité de la BHE varie selon la taille et la croissance des métastases cérébrales.





**Figure 1.7** Coupe d'un capillaire cérébral.

Contrairement aux capillaires des tissus périphériques, les capillaires cérébraux sont composés de cellules endothéliales reliées entre elles par des jonctions serrées. La proximité des pieds astrocytaires et des péricytes contribue à la spécialisation de l'endothélium vasculaire cérébral. Figure tirée de (Weil *et al.*, 2005).

La réussite limitée dans le traitement de tumeurs au système nerveux central réside dans la résistance naturelle ou acquise des tumeurs à la chimiothérapie. L'imperméabilité de la BHE limite l'entrée de la majorité des molécules dans le SNC, à l'exception des petites molécules lipophiles. Les CE de la BHE expriment plusieurs récepteurs destinés à faciliter les processus de transport transendothélial des molécules essentielles du sang vers le tissu nerveux, et ce de manière strictement contrôlée (Abbott et Romero, 1996). L'expression de transporteurs d'efflux à la surface des CE de la BHE assure le maintien de l'homéostasie cérébrale. Parmi ceux-ci, la P-gp et les MRP empêchent le passage de certaines molécules vers le cerveau et expulsent les molécules potentiellement toxiques du cerveau vers la circulation sanguine (Lee *et al.*, 2001). Pour ces raisons, le traitement des tumeurs cérébrales primaires et métastatiques s'avère ardu. La radiothérapie demeure l'option thérapeutique principale dans le traitement de métastases cérébrales. La thérapie au couteau gamma

(*gamma knife therapy*) constitue un des traitements les plus prometteurs puisqu'il évite les radiations au cerveau en entier (Chang, Robins et Mehta, 2007). La chirurgie peut aussi être envisagée lorsque le sujet présente une métastase unique et un état de santé satisfaisant. Finalement, différentes stratégies permettent d'améliorer le passage intracérébral des médicaments. L'une d'entre elles consiste à modifier la perméabilité de la BHE par perfusion de solution hyperosmotique de mannitol ou par injection de dérivés vasoactifs comme la bradykinine (Doolittle *et al.*, 1998). Il est aussi possible d'administrer de façon concomitante un bloqueur de P-gp afin d'augmenter les concentrations intracellulaires de l'agent anticancéreux (Malingre *et al.*, 2001). La combinaison de radiothérapie, de chirurgie et de chimiothérapie est fréquemment employée pour limiter la progression des métastases dans le SNC. Cependant, peu de recherches misent sur la prévention du phénomène métastatique.

Plusieurs modèles murins de métastases cérébrales ont été mis au point pour les mélanomes (Cranmer *et al.*, 2005), les carcinomes pulmonaires (Mathieu *et al.*, 2004) et mammaires (Price, 1996; Monsky *et al.*, 2002). Ces modèles sont fréquemment basés sur des lignées cellulaires humaines ou murines présentant des habiletés métastatiques intrinsèques. Parmi celles-ci, certaines lignées ont été sélectionnées en raison de leur incidence élevée à produire des métastases cérébrales préférentiellement aux autres organes. Les voies d'injection utilisées dans ces modèles animaux sont principalement la veine de la queue, l'artère carotidienne et le ventricule gauche du cœur (Palmieri *et al.*, 2007). Bien que ces deux dernières voies représentent un défi expérimental, elles favorisent la colonisation du cerveau puisque le lit capillaire cérébral est le premier rencontré par les cellules tumorales. Certaines études qualifient également le modèle d'implantation intracérébrale de cellules cancéreuses par stéréotaxie comme un modèle valable de métastases cérébrales. Toutefois, ce modèle fait abstraction de plusieurs étapes décisives du développement métastatique et peut causer un traumatisme crânien pouvant affecter la croissance des microtumeurs. Les modèles *in vitro* incluent : la co-culture de cellules tumorales et de cellules cérébrales (Krizanac-Bengez *et al.*, 2003; Hori *et al.*, 2004), l'invasion transendothéliale de cellules tumorales à travers une monocouche de cellules endothéliales vasculaires cérébrales (Price *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2006), de même que des essais d'invasion *ex vivo* de tranche cérébrale (Murry *et al.*, 2006).

## 1.4 La mélanotransferrine

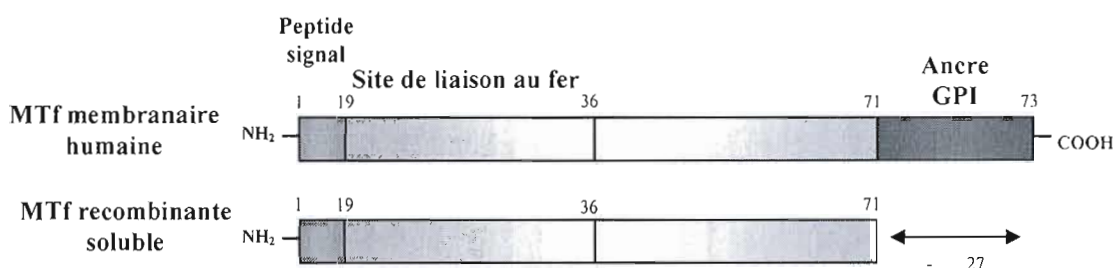
La mélanotransferrine (MTf), ou p97, est l'un des premiers marqueurs cellulaires des mélanomes ayant été identifié dans le début des années 1980 (Brown *et al.*, 1981a). Elle est exprimée en petites quantités dans certains tissus sains comme dans les glandes salivaires, les tissus fœtaux et l'endothélium cérébral, mais également au niveau des cellules épithéliales intestinales et des cellules endothéliales hépatiques (Alemany *et al.*, 1993). Cependant, son expression est principalement associée aux cellules néoplasiques et plus particulièrement les mélanomes (Woodbury *et al.*, 1980; Brown *et al.*, 1981b). Des études rapportent l'expression de la MTf dans les CE de capillaires cérébraux humains ainsi que dans les cellules de la microglie au niveau des plaques séniles de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Yamada *et al.*, 1999). La MTf est une protéine membranaire présentant une homologie élevée avec les membres de la famille des transferrines. En fait, la MTf partage une homologie de séquence de 37 à 39 % avec la transferrine sérique (Tf), la lactoferrine (Lf) ainsi qu'avec l'ovotransferrine.

### 1.4.1 Organisation génomique et moléculaire de la mélanotransferrine

Le gène codant pour la MTf a été identifié dans dix organismes différents, lesquels sont l'humain, le chimpanzé, le lapin, le singe rhésus, la vache, la souris, le rat, le chien, le poulet et le *poisson-zèbre*. La MTf isolée de ces organismes présente de 46 à 88 % d'homologie de séquence avec la protéine humaine. Le gène de la MTf humaine code pour deux transcrits : un premier isoforme comportant 16 exons et 2377 bases et un second avec sept exons et 1651 bases (Sekyere, Dunn et Richardson, 2003). Des données récentes rapportent la répartition de deux transcrits à travers tous les tissus humains, et identifient un troisième transcrit retrouvé exclusivement au niveau du cœur et des muscles squelettiques (Sekyere, Dunn et Richardson, 2005). La génération de plusieurs transcrits à partir d'un gène unique proviendrait d'un épissage alternatif et de polyadénylation. La présence des transcrits de MTf a également été identifiée dans les lignées cellulaires de mélanomes SK-Mel 28 et SK-Mel 2 (Sekyere, Dunn et Richardson, 2005). La portée de ces variants dans les tissus sains demeure toutefois méconnue.

#### 1.4.2 Structure protéique de la mélanotransferrine humaine

La MTf est une glycoprotéine monomérique de 97,000 Daltons associée à la membrane plasmique par une ancre de type glycosyle phosphatidylinositol (GPI) (Alemany *et al.*, 1993; Food *et al.*, 1994). La structure protéique de la MTf se résume à quatre régions : un peptide signal de 19 résidus hydrophobiques; un domaine N-terminal extracellulaire responsable de la liaison du fer et composé de 342 acides aminés; un domaine C-terminal extracellulaire composé de 352 résidus, et une portion de 25 acides aminés hydrophobiques responsable de l'ancrage de type GPI (Rose *et al.*, 1986). Ce type d'attachement protéique à la membrane cellulaire peut être hydrolysé par certaines enzymes dont la phospholipase-C. Cette enzyme permet le relâchement de plus de 95% de la MTf sous forme soluble à la surface de cellules de mélanome humain (SK-MEL 28) (Alemany *et al.*, 1993; Food *et al.*, 1994). En fait, ce mode d'ancrage facilite la régulation de la localisation à la surface cellulaire, la signalisation transmembranaire ainsi que le recyclage des protéines associées à la membrane plasmique. Ce moyen d'attachement cellulaire confère à la MTf diverses propriétés avantageuses dont la polarisation cellulaire (Lisanti *et al.*, 1989) et la capacité de concentration en domaines lipidiques spécialisés (Sargiacomo *et al.*, 1993).



**Figure 1.8** Structure protéique de la mélanotransferrine humaine.

La MTf membranaire possède un domaine N-terminal ayant la capacité de lier une molécule de fer et une portion de 25 acides aminés (a.a.) responsable de l'attachement de l'ancre GPI. Une forme recombinante de la MTf humaine a été réalisée en supprimant 27 acides aminés à l'extrémité C-terminale. Cette délétion génère une protéine soluble. Illustration modifiée de (Yang *et al.*, 2004).

La MTf humaine a tout d'abord été observée par des analyses SDS-PAGE, où la protéine migre à un poids approximatif de 97 kDa en conditions réductrices (Woodbury *et al.*, 1980). Par la suite, l'utilisation de conditions non-réductrices a permis l'identification de deux isoformes migrant respectivement à 79 et 82 kDa (Desrosiers *et al.*, 2003). Ces résultats ont été obtenus grâce à un anticrops monoclonal dirigé contre la MTf humaine appelé le L235. Les différents isoformes résulteraient de modifications post-traductionnelles, telle que la glycosylation (Desrosiers *et al.*, 2003). Des sites de glycosylation ont été identifiés aux résidus en position 38 et 135 de l'extrémité N-terminale, de même qu'en position 515 de l'extrémité C-terminale (Brown *et al.*, 1981a; Rose *et al.*, 1986).

Bien que la MTf puisse également être sécrétée dans la circulation (sMTf), sa concentration ne représente qu'une fraction de la composition sérique d'individus sains, soit de 1,3 à 2,7 ng/mL (Brown *et al.*, 1981b; Kim *et al.*, 2001). Néanmoins, la sMTf endogène a été identifiée dans le milieu de culture de cellules de mélanomes, de même que dans l'urine, la salive et le liquide cérébro-spinal (Food *et al.*, 1994; Yamada *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2001; Desrosiers *et al.*, 2003). L'origine exacte de la sMTf endogène demeure méconnue et elle pourrait provenir d'une transformation inappropriée de la MTf membranaire (mMTf) empêchant l'association à l'ancre GPI, d'une coupure de l'ancre GPI par une phospholipase, ou d'un épissage alternatif de l'ARNm (McNagny *et al.*, 1996). La relation entre la MTf ancrée à la membrane et la forme soluble de la protéine a été mise en évidence par l'équipe de Jefferies (Yang *et al.*, 2004). Leurs études, basées sur des essais de délétion d'acides aminés et de mutagenèse dirigée, démontrent qu'un minimum de 13 acides aminés hydrophobiques à l'extrémité carboxyle terminale de la MTf est nécessaire pour former une ancre GPI fonctionnelle lui permettant d'être sécrétée sous forme soluble. Au cours des 10 dernières années, la littérature fait état d'une forme recombinante de la MTf membranaire. Bien qu'on l'ait désignée sous plusieurs appellations différentes à travers les publications (hr-sMTf, sMTf, sr-MTf), le nom employé pour la MTf tronquée recombinante dans cet ouvrage sera la sMTf recombinante. L'insertion d'un codon stop après le résidu glycine en position 711 de l'ADN codant pour la mMTf entraîne l'élimination de 27 acides aminés à l'extrémité C-terminale (Figure 1.8). Ainsi, la protéine résultante demeure soluble puisqu'elle ne

présente aucune séquence permettant l'association d'une ancre GPI (Yang *et al.*, 2004).

#### **1.4.2 Activité biologique de la mélanotransferrine humaine**

##### **1.4.2.1 Le métabolisme du fer**

Le fer est un élément essentiel comme source d'énergie cellulaire puisqu'il intervient dans de nombreuses réactions métaboliques majeures comme la synthèse de l'ATP et de l'ADN (Demeule *et al.*, 2002). En raison de l'importance vitale du fer, divers mécanismes ont été mis en place pour assurer son transport. La Tf libère le fer aux cellules par le biais de l'internalisation par endocytose du complexe formé avec son récepteur. Le fer est ainsi relâché à l'intérieur de la cellule au niveau des endosomes où il est ensuite utilisé directement par la cellule ou emmagasiné sous forme de complexe avec la ferritine. La principale différence entre la MTf et ses homologues de la famille des transferrines réside dans le nombre de molécules de fer pouvant y être associées. Les membres de la famille des transferrines possèdent une caractéristique majeure commune consistant à pouvoir lier de façon réversible deux ions ferriques par molécule grâce aux lobes identiques situés aux extrémités N- et C-terminales (Baker *et al.*, 1992). Le site de liaison de la MTf au fer consiste en un motif DYRYH, comprenant les acides aminés Asp<sub>78</sub>, Tyr<sub>107</sub>, Arg<sub>136</sub>, Tyr<sub>210</sub> et His<sub>279</sub> (Baker et Lindley, 1992). Contrairement à la Tf humaine, les substitutions de Asp<sub>421</sub> et Asp<sub>482</sub> par des sérines à l'extrémité carboxyle de la MTf entraînent des changements majeurs dans le lobe globulaire de cette extrémité (Baker *et al.*, 1992). Par conséquent, la MTf ne peut lier qu'un ion Fe<sup>3+</sup> grâce à son lobe situé à l'extrémité N-terminale.

La MTf a tout d'abord été considérée comme un joueur important dans le métabolisme du fer. En effet, l'hypothèse de départ stipulait que la surexpression de la MTf à la surface des mélanomes avait pour rôle d'assurer l'apport en fer nécessaire à leur prolifération (Sekyere et Richardson, 2000). Afin de vérifier cette hypothèse, une étude a été réalisée sur la lignée cellulaire de mélanomes humains SK-Mel 28, connue pour exprimer des niveaux particulièrement élevés de MTf, soit  $3,8 \times 10^5$  sites/cellules (Brown *et al.*, 1982;

Food, Sekyere et Richardson, 2002). Or, les résultats de cette étude montrent que la suppression de la MTf à la surface des cellules SK-Mel 28 par l'action de la phospholipase-C ne modifie pas le captage cellulaire de fer (Richardson, 2000). Ainsi, la MTf ne participerait pas activement au métabolisme du fer dans les cellules de mélanomes. Paradoxalement, l'expression de MTf dans les cellules ovariennes de hamster Chinois (CHO), à des niveaux atteignant  $1,2 \times 10^6$  sites/cellules, accroît significativement le captage cellulaire du fer par rapport aux cellules de mélanomes SK-Mel 28 (Sekyere et Richardson, 2000). Toutefois, le captage du fer dépendant de l'expression de la MTf dans les cellules CHO s'affaiblirait en fonction du temps et ne serait pas proportionnel aux niveaux d'expression de MTf membranaire (Kennard *et al.*, 1995).

L'expression du récepteur de la Tf est notamment régulée par les niveaux intracellulaire de fer. Plusieurs études ont été menées afin de déterminer si l'expression de la MTf pouvait être modulée de manière similaire. Or, l'expression de la MTf ne s'avère pas affectée par une déficience en fer ou par une augmentation de l'état prolifératif des cellules SK-Mel 28 (Seligman *et al.*, 1986; Richardson, 2000). Par ailleurs, les niveaux de MTf ne sont pas plus élevés dans les tissus nécessitant un apport élevé en fer, tels que la moelle osseuse, le placenta et le foie (Seligman *et al.*, 1986; Richardson, 2000). Afin de confirmer les résultats *in vitro*, un modèle de souris déficientes pour le gène de la MTf (*MTf*<sup>-/-</sup>) a été établi. Les souris déficientes en MTf présentent un développement sans anomalies histologiques ou morphologiques. Dans ce modèle, les niveaux sériques et tissulaires en fer des souris *MTf*<sup>-/-</sup> et *MTf*<sup>+/+</sup> ne présentaient aucune différence significative (Dunn *et al.*, 2006; Sekyere *et al.*, 2006).

Dans un autre ordre d'idée, il a été rapporté que la forme recombinante de la sMTf participait à la transcytose du fer à travers un modèle *in vitro* de la BHE (Demeule *et al.*, 2002; Moroo *et al.*, 2003). Par homologie, la sMTf aurait pu avoir un rôle similaire à la Tf, c'est-à-dire capter le fer en circulation afin de l'acheminer aux cellules. Le transport transendothélial de la sMTf est un processus saturable et dépendant de la température qui s'effectuerait par un mécanisme indépendant du récepteur de la Tf (Demeule *et al.*, 2002). De

plus, notre équipe a récemment démontré que la sMTf serait internalisée par LRP en collaboration avec annexine-II (Michaud-Levesque, Demeule et Béliveau, 2007). LRP est un important récepteur au niveau cérébral (Fillebeen *et al.*, 1999). L'efficacité de la sMTf à transporter le fer au cerveau a été le sujet de plusieurs études. D'une part, des données indiquent que la sMTf transporterait le fer au cerveau de manière plus efficace que la Tf et ce, autant dans un modèle *in vitro* de la BHE que dans un modèle de perfusion cérébrale *in situ* chez la souris (Demeule *et al.*, 2002; Moroo *et al.*, 2003). D'autre part, les niveaux d'accumulation cérébrale de la sMTf et de l'albumine étaient comparables dans un modèle de perfusion cérébrale *in situ* (Pan *et al.*, 2004). De plus, l'accumulation du fer au cerveau est davantage significative lorsqu'elle est mesurée en présence de la Tf que de la sMTf (Richardson et Morgan, 2004). Bien qu'une petite fraction de la sMTf soit incorporée au cerveau à partir du plasma, il a été démontré que la sMTf ne relâchait pas adéquatement le fer aux cellules (Food, Sekyere et Richardson, 2002). Les études *in vitro* et *in vivo* permettent donc de conclure qu'en dépit de la présence d'un site à forte affinité pour le fer sur la MTf, membranaire ou soluble, cette protéine ne joue pas un rôle essentiel dans l'homéostasie ni dans le métabolisme du fer.

#### 1.4.2.2 La maladie d'Alzheimer

L'identification de la MTf au niveau des cellules de la microglie associées aux plaques amyloïdes dans le cerveau de personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer a déclenché une série d'études ayant pour but de déterminer le rôle de la MTf dans le développement de cette maladie (Jefferies *et al.*, 1996; Ujiie, Dickstein et Jefferies, 2002). Il a d'abord été démontré que les niveaux de MTf soluble étaient 5 fois plus élevés dans le sérum et le fluide cérébrospinal des patients atteints de la maladie que chez les sujets sains (Kennard *et al.*, 1996; Rothenberger *et al.*, 1996). À la lueur de ces résultats, il a été suggéré que la sMTf endogène soit utilisée comme marqueur biochimique de la maladie d'Alzheimer (Kennard *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2001). Par la suite, notre équipe n'a détecté aucune différence significative entre les niveaux sérique, urinaire et salivaire de sMTf chez les patients atteints comparativement à ceux des sujets sains (Desrosiers *et al.*, 2003).



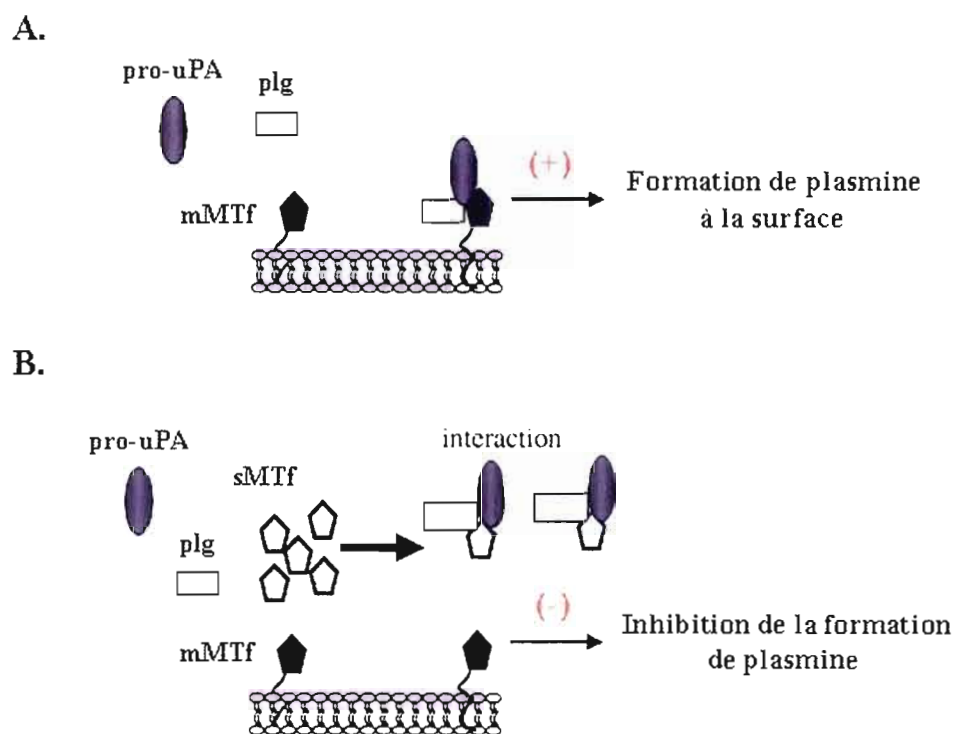
L'implication de la sMTf dans la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer demeure donc controversée.

#### 1.4.2.3 *Le développement angiogénique et la croissance tumorale*

Le mélanome est un cancer cutané dont le potentiel métastatique est élevé et le pronostic redoutable. La croissance et la dissémination des mélanomes dépendent essentiellement de leur niveaux d'angiogénèse (Denijn et Ruiter, 1993; Neitzel *et al.*, 1999). La surexpression de la MTf dans ces types de cancers confère un intérêt certain à cette protéine. De fait, l'association entre la MTf et le développement angiogénique a d'abord été mis en évidence par l'équipe de Jefferies (Sala *et al.*, 2002). Lorsqu'utilisée comme agent attractant, la sMTf recombinante stimule la migration des CE HMEC-1 à travers les chambres de Boyden. De plus, la sMTf recombinante induit la vascularisation de la membrane chorioallantoïque d'embryon de poulet (test *CAM*) (Sala *et al.*, 2002). Cette étude établit une corrélation entre l'expression de la MTf à la surface des mélanomes et leur vascularisation, suggérant ainsi une fonction pro-angiogénique associée à la mMTf. Par la suite, notre équipe a cherché à déterminer les effets de la MTf par son association au plasminogène. Nous avons démontré que la sMTf recombinante lie le plasminogène et stimule son activation par l'intermédiaire de son activateur de type urokinase (Demeule *et al.*, 2003). En fait, la sMTf recombinante facilite l'activation du zymogène en réduisant le  $K_m$  du pro-uPA et en augmentant la  $V_{max}$  de la réaction. La formation de plasmine via l'uPA joue un rôle prépondérant dans la dégradation de la MEC par les cellules de mélanomes (Montgomery *et al.*, 1993). Au cours de la dernière décennie, plusieurs évidences ont démontré l'implication du système uPA/plasminogène dans la progression tumorale (Andreasen *et al.*, 1997).

Récemment, notre équipe a démontré que les effets pro-angiogéniques et pro-invasifs de la mMTf dépendaient de la stimulation du plasminogène à la surface cellulaire (Demeule *et al.*, 2003; Michaud-Levesque, Demeule et Beliveau, 2005). La MTf membranaire agit comme un récepteur du plasminogène à la surface cellulaire et favorise son activation en

plasmine. La mMTf aurait pour effet de localiser la formation de plasmine à la surface cellulaire tout en protégeant la plasmine de ses inhibiteurs endogènes. La stimulation du système d'activation du plasminogène par la MTf membranaire mène à une augmentation de la motilité cellulaire et de la tubulogenèse *in vitro* (Michaud-Levesque, Demeule et Beliveau, 2005; Michaud-Levesque *et al.*, 2005). Parallèlement, la sMTf recombinante antagonise ce mécanisme en compétitionnant avec la liaison du plasminogène à la surface membranaire (Figure 1.9). En fait, la perturbation de l'équilibre entre les deux formes de MTf permet de réguler la migration des cellules endothéliales et néoplasiques. Suite à l'association de la sMTf recombinante au plasminogène et à l'uPA, le complexe se lie à l'uPAR à la surface cellulaire. L'internalisation de l'uPAR est médiée par LRP et permet la régénération des récepteurs libres à la membrane plasmique (voir l'illustration du recyclage à la Figure 1.3) (Michaud-Levesque *et al.*, 2005). Or, la sMTf recombinante affecte le recyclage de ces récepteurs puisqu'elle induit une réduction de l'expression de LRP, tout en occupant les récepteurs uPAR libres à la surface cellulaire. Ainsi, la liaison de l'uPA libre à son récepteur et la conversion du plasminogène sont réduites (Michaud-Levesque *et al.*, 2005). La cascade d'événements déclenchés par la sMTf recombinante a pour conséquences l'inhibition de la migration des CE et leur différenciation en structures de types capillaires. L'administration de la sMTf permet également de contrôler la vascularisation d'implant de Matrigel stimulée par le VEGF ou le bFGF (Michaud-Levesque, Demeule et Beliveau, 2007). Compte tenu de la faible concentration plasmatique de la sMTf, son impact physiologique réel demeure inconnu.



**Figure 1.9** Représentation schématique de la dichotomie de la mélanotransferrine.

Ce schéma résume les activités pro- et anti-angiogéniques de la MTf membranaire (mMTf) et soluble recombinante (sMTf). (A) L'interaction du pro-uPA et du plasminogène (plg) avec la mMTf favorise la formation de plasmine à la surface et stimule la migration cellulaire. (B). Par opposition, la sMTf recombinante empêche la liaison du plasminogène à la membrane plasmique et inhibe les processus favorisés par la mMTf. Tiré et modifié de (Demeule *et al.*, 2003).

Bien que les souris déficientes pour le gène de la MTf ne présentent aucun phénotype particulier, la MTf pourrait jouer un rôle important dans le comportement des cellules qui l'expriment de manière considérable, comme les mélanomes. Récemment, Dunn et coll (Dunn *et al.*, 2006) démontraient que la régulation post-transcriptionnelle de la MTf dans les cellules SK-Mel 28 par *siRNA* réduisait significativement leur prolifération *in vitro* et la croissance tumorale chez la souris. La régulation négative de l'expression de la MTf par *siRNA* a aussi permis de montrer que la MTf contribue au phénotype invasif des cellules SK-

Mel 28 *in vivo* (Bertrand *et al.*, 2007).

Il est intéressant de noter que la MTf n'est pas la seule protéine de la famille des transferrines à être impliquée dans le processus angiogénique. En effet, la Tf, la lactoferrine (Lf), de même que l'ovotransferrine modulent la progression tumorale. La Tf stimule la vascularisation cartilagineuse lors de la formation des os et du développement métastatique (Cavallaro, Liebner et Dejana, 2006). La Tf humaine et l'ovotransferrine favorisent également la vascularisation de la membrane chorioallantoïque de l'embryon de poulet (Carlevaro *et al.*, 1997). La Lf, quant à elle, potentialise la migration et la prolifération des CE stimulées par le VEGF via son récepteur le VEGFR-2 (Norrby, 2004; Kim *et al.*, 2006). Par opposition, une étude a démontré que la lactoferrine bovine inhibait l'angiogenèse tumorale en induisant l'interleukine-8 (Shimamura *et al.*, 2004). L'interleukine-8 est une cytokine connue pour bloquer la croissance tumorale et le développement métastatique en agissant sur les cellules effectrices, comme les macrophages et les neutrophiles (Siders *et al.*, 1998; Cao *et al.*, 1999). Quoiqu'il en soit, les propriétés dichotomiques de la MTf et des membres de la famille des transferrines nécessitent de plus amples investigations afin d'être pleinement exploitées.

#### 1.4.2.4 Autres rôles possibles

La stimulation du processus inflammatoire suite à des lésions vasculaires induit la sécrétion du facteur tissulaire par les CE et génère la formation d'une MEC provisoire constituée de fibrine (Zucker *et al.*, 1998). La collaboration de la fibrine aux composantes de la MEC prend notamment part aux mécanismes de migration et de prolifération cellulaires (Eliceiri *et al.*, 1999). Il a été rapporté que la MTf avait la capacité de dégrader des caillots de fibrine en stimulant l'activation du plasminogène par le tPA (Bertrand *et al.*, 2006). Ces résultats s'avèrent non seulement intéressants pour stopper la progression tumorale, mais aussi particulièrement prometteurs pour le traitement de désordres de coagulation sanguine.

Les résultats démontrant la transcytose de la sMTf à travers la BHE soulèvent un

point intéressant. La perméabilité de la BHE à cette protéine permettrait l'élaboration d'un système novateur de libération de médicaments au cerveau (Demeule *et al.*, 2002). Cette idée fait déjà l'objet d'un brevet selon lequel le couplage d'agents de chimiothérapie à la sMTf augmenterait leur passage au SNC et leur efficacité (CA2450073, WO2003/009815).

Depuis l'analyse de sa structure protéique, plusieurs rôles ont été attribués par défaut à la MTf. Parmi ceux-ci, notons une activité de type métalloprotéasique. En effet, la MTf humaine possède une séquence consensus de liaison au zinc identique à celle présente chez les métalloprotéases (MMPs) (Garratt et Jhoti, 1992; Nappi et Vass, 2000). Cependant, si cette activité métalloprotéasique constituait une fonction majeure de la MTf, elle aurait été conservée à travers les espèces. Or, ce motif est absent chez la souris, le poulet et le lapin, suggérant ainsi que la MTf ne renferme pas d'activité métalloprotéasique significative chez ces espèces (Sekyere et Richardson, 2000).

#### ***1.4.4 La mélanotransferrine comme cible thérapeutique***

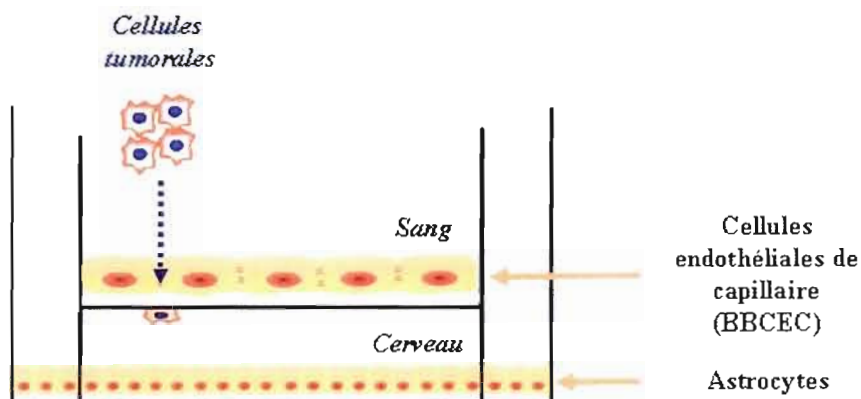
L'expression importante de la MTf à la membrane de plusieurs cellules néoplasiques ainsi que son implication dans le système d'activation du plasminogène en font une cible thérapeutique prometteuse. L'utilisation de la sMTf recombinante comme agent compétiteur semble efficace puisqu'elle présente peu de toxicité et bloque significativement le développement angiogénique. Toutefois, il est possible de bloquer les fonctions de la MTf membranaire par une stratégie différente, c'est à dire par l'utilisation d'anticorps monoclonaux. Cette possibilité a déjà été soulevée par Estin et col en 1988 (Estin *et al.*, 1988) et représente une alternative aux thérapies classiques contre le cancer (Komenaka, Hoerig et Kaufman, 2004). À cet effet, plusieurs études ont démontré que l'immunothérapie contre la mMTf s'avérait encourageante (Estin *et al.*, 1988; Kahn *et al.*, 1991; Riedle, Rosel et Zoller, 1998). Cependant, la détection d'ARNm de la MTf dans les tissus normaux indique que son expression n'est pas exclusive aux tumeurs. L'administration d'anticorps contre la mMTf pourrait ainsi induire une certaine toxicité (Kawamoto *et al.*, 1998; Dunn *et al.*, 2006). Par ailleurs, les niveaux d'expression de la MTf font preuve d'une grande variabilité au sein des mélanomes (Woodbury *et al.*, 1980; Brown *et al.*, 1981b). Hormis

l'identification de la MTf membranaire comme cible thérapeutique, l'ensemble des travaux permet de la suggérer comme indicateur d'agressivité des tumeurs malignes.

### 1.5 Hypothèses de travail et objectifs expérimentaux

La progression tumorale regroupe plusieurs processus dont l'angiogenèse, la croissance tumorale et la dissémination métastatique. L'initiation du développement angiogénique est déclenchée suite à un déséquilibre entre les régulateurs positifs et négatifs. L'activation de protéases constitue une étape cruciale dans la dégradation de la MEC et la prolifération tumorale. De ce fait, la conversion du plasminogène en plasmine par ses activateurs représente une étape-clé dans la progression tumorale. Les résultats de notre équipe ont déjà démontré que la MTf stimulait l'activation du plasminogène par l'uPA (Demeule *et al.*, 2003). La première partie de la recherche présentée dans cette thèse vise à évaluer la participation de la sMTf recombinante dans la formation de plasmine par le tPA. Bien que le tPA soit majoritairement associé au système fibrinolytique, du fait qu'il possède une forte affinité envers la fibrine, il participerait également à la dégradation de la MEC lors du développement angiogénique (Sato *et al.*, 1993; Collen, 1999). Les effets de la plasmine sur les composantes de la MEC ont été évalués à l'aide de cellules endothéliales microvasculaires humaines (HMEC-1).

Il a été démontré récemment que la sMTf recombinante inhibait le développement angiogénique *in vivo* (Michaud-Levesque, Demeule et Beliveau, 2007). Or, la formation de nouveaux vaisseaux sanguins est essentielle pour la croissance tumorale. Pour ces raisons, la seconde portion de cette étude a pour but d'évaluer l'impact de la sMTf recombinante sur la croissance tumorale *in vivo*. Les effets de la sMTf recombinante ont été étudiés sur la croissance de tumeurs dérivées de deux types cellulaires : des cellules de carcinomes pulmonaires exprimant fortement la MTf membranaire et une lignée cellulaire de glioblastomes humains n'exprimant pas la mMTf.



**Figure 1.10** Modèle *in vitro* de la BHE.

Des cellules endothéliales isolées de capillaires cérébraux (BBCEC) sont cultivées en présence d'astrocytes afin de favoriser l'établissement d'une barrière reproduisant les caractéristiques de la BHE *in vivo*. Les cellules tumorales sont déposées sur la monocouche de BBCEC et leur migration transendothéliale à travers le modèle *in vitro* de la BHE est étudiée.

Finalement, la participation de la MTF membranaire a été étudiée dans le développement de métastases cérébrales. La dissémination métastatique nécessite l'action concertée de processus moléculaires permettant l'extravasation des cellules tumorales et leur prolifération en micro-tumeurs. Pour déterminer la dissémination métastatique de cellules SK-Mel 28 de mélanome humain, nous avons utilisé un modèle de souris immunosupprimées auxquelles ont été administrées les cellules cancéreuses par injection intraveineuse. Par la suite, la capacité des cellules cancéreuses à traverser la BHE a été étudiée grâce à un modèle de co-culture *in vitro*. Tel qu'illustré à la Figure 1.10, ce modèle est constitué d'une monocouche de CE isolées de capillaires cérébraux (BBCEC) cultivées en présence d'astrocytes.

Globalement, ce projet vise d'une part à distinguer les propriétés dichotomiques de la MTF membranaire et soluble; et d'autre part à évaluer la mMTf en tant que cible thérapeutique dans la progression tumorale en élaborant des traitements basés sur la sMTf recombinante et sur le L235, un Ac monoclonal dirigé contre la MTF humaine.

## CHAPITRE II

### ARTICLES

**2.1 Melanotransferrin stimulates t-PA-dependent activation of plasminogen in endothelial cells leading to cell detachment.** Y. Rolland, M. Demeule et R. Béliveau. 2006. *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1763, p. 393-401.

**2.2 Inhibition of tumor growth by a truncated and soluble form of melanotransferrin.** Y. Rolland, M. Demeule, J. Michaud-Levesque et R. Béliveau. 2007. *Exp. Cell Res.*, vol. 313, p. 2910-2919.

**2.3 Melanotransferrin targeting by a monoclonal antibody inhibits the formation of melanoma brain metastasis.** Y. Rolland, M. Demeule, L. Fenart et R. Béliveau. 2008. Manuscrit soumis à *Pigment cell and melanoma research*. Soumis à *Pigment Cell and Melanoma Research*.



## CONTRIBUTION DE L'AUTEUR PRINCIPAL ET DES CO-AUTEURS

**Note : Seul l'auteur principal peut utiliser l'article mentionné ci-dessous pour sa thèse. Aucune autre personne, incluant les autres co-premiers auteurs le cas échéant, ne pourra utiliser l'article dans une thèse ou un mémoire.**

Description du rôle de chacun des auteurs en commençant par l'auteur principal : tâches et responsabilité spécifiques, nature de la contribution à l'article (rédaction, expérimentation, figures, recherche bibliographique, etc.)

Yannève Rolland a effectué la recherche bibliographique, réalisé la totalité des expérimentations, analysé les résultats et écrit le manuscrit.

La supervision du projet portant sur la mélanotransferrine au Laboratoire de Médecine Moléculaire a été effectuée par le Dr. Michel Demeule. Dr. Demeule a ainsi contribué à l'élaboration du plan expérimental et à l'évaluation critique du manuscrit.

En tant que directeur de thèse, le Dr. Richard Béliveau a fourni l'encadrement professionnel, intellectuel et technique nécessaire à la réalisation de cet article.

## ATTESTATION DE L'AUTEUR PRINCIPAL ET DU DIRECTEUR DE RECHERCHE

L'auteur principal de l'article intitulé :

**Melanotransferrin stimulates t-PA-dependent activation of plasminogen in endothelial cells leading to cell detachment.**

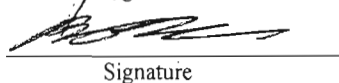
soumis pour publication , accepté pour publication , ou publié ✓ dans : Biochimica et Biophysica Acta  
est :

Auteur principal Yannève Rolland  
Nom

  
Signature

27-06-2008  
Date

Directeur de recherche Richard Béliveau  
Nom

  
Signature

27/06/08  
Date

**ACCEPTATION DES CO-AUTEURS POUR L'UTILISATION  
D'UN ARTICLE DANS UNE THÈSE**

**Note : Seul l'auteur principal peut utiliser l'article mentionné ci-dessous pour sa thèse. Aucune autre personne, incluant les autres co-premiers auteurs le cas échéant, ne pourra utiliser l'article dans une thèse ou un mémoire.**

Nous entérinons que           Yannève Rolland

est l'auteur principal de l'article intitulé

**Melanotransferrin stimulates t-PA-dependent activation of plasminogen in endothelial cells leading to cell detachment.**

et qu'il peut l'utiliser pour sa thèse

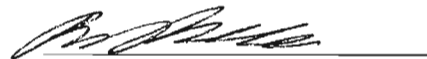
Co-auteur(s)

1) Demeule, Michel  
Nom, prénom

  
Signature

27 juin 2008  
Date

2) Béliveau, Richard  
Nom, prénom

  
Signature

27/06/08  
Date

## 2.1 Melanotransferrin stimulates t-PA-dependent activation of plasminogen in endothelial cells leading to cell detachment

Yannève Rolland, Michel Demeule and Richard Béliveau

*Laboratoire de Médecine Moléculaire, Service d'Héмато-Oncologie, Hôpital Ste-Justine-  
Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8.*

Corresponding author: Richard Béliveau, Laboratoire de Médecine Moléculaire, Service d'Hémato-Oncologie, Hôpital Ste-Justine-UQAM, C.P. 8888, Succursale Centre-ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8. E-mail : [oncomol@nobel.si.uqam.ca](mailto:oncomol@nobel.si.uqam.ca)

**Keywords:** melanotransferrin; plasminogen; tissue-type plasminogen activator; matrix metalloproteinase; fibronectin; endothelial cell; detachment.

## RÉSUMÉ

L'activateur du plasminogène de type tissulaire (t-PA) est une protéase sérique extracellulaire impliquée dans la conversion du zymogène en plasmine, une protéase pro-angiogénique puissante. La plasmine est un joueur important dans la fibrinolyse, la migration cellulaire, le remodelage tissulaire et l'invasion tumorale. Cette étude vise à étudier l'impact d'une forme tronquée de la mélanotransferrine (sMTf) sur l'activation du plasminogène par le t-PA, ainsi que sur le détachement subséquent des cellules endothéliales (CE). Le traitement de cellules endothéliales microvasculaires humaines avec une combinaison de plasminogène, de t-PA et de sMTf augmente de manière significative les niveaux de plasmine, de même que son activité protéolytique dans le milieu de culture. Les résultats montrent que la plasmine générée en présence de sMTf mène à une diminution de 30% de la fibronectine associée aux cellules et à une augmentation concomitante de la fibronectine relarguée dans le milieu de culture. De plus, la combinaison de la sMTf au plasminogène et t-PA induit le détachement des CE. Parmi les inhibiteurs du système plasminolytique utilisés, l' $\alpha_2$ -antiplasmine prévient complètement la formation de plasmine ainsi que le détachement des CE. Le détachement des CE est aussi inhibé par des inhibiteurs de métalloprotéases matricielles, comme l'épigallocatechine gallate (EGCG) et le GM6001, mais toutefois sans interférer significativement avec l'activation du plasminogène. Les données présentées suggèrent globalement que les propriétés anti-angiogéniques de la sMTf résulteraient d'une stimulation locale excessive de l'activation du plasminogène par le t-PA, menant à la dégradation de la matrice de fibronectine et au détachement des CE.

## ABSTRACT

Tissue plasminogen activator (t-PA) is an extracellular serine protease that converts the proenzyme plasminogen into the broad-spectrum substrate serine protease, plasmin. Plasmin, one of the most potent pro-angiogenic factors, is a key element in fibrinolysis, cell migration, tissue remodeling and tumor invasion. In the present investigation, we assessed the impact of the truncated form of soluble melanotransferrin (sMTf) on plasminogen activation by t-PA and subsequent endothelial cell detachment. Co-treatment of human endothelial microvessel cells with plasminogen, t-PA and sMTf significantly increased plasmin formation and activity in the culture medium. Plasmin generated in the presence of sMTf also led to a 30% reduction in fibronectin detection within cell lysates and to a 9-fold increase within the corresponding cell medium. Moreover, the presence of sMTf increases EC detachment by 6-fold compared to cells treated only with plasminogen and t-PA. Although the addition of  $\alpha_2$ -antiplasmin completely prevented plasmin formation and EC detachment, epigallocatechin gallate, GM6001 and a specific antibody directed against MMP-2 prevented cellular detachment without interfering with plasminogen activation. Overall, these data suggest that the anti-angiogenic properties of sMTf may result from local overstimulation of plasminogen activation by t-PA, thus leading to subsequent degradation of the Fn matrix and EC detachment.

## INTRODUCTION

First identified as a major antigen in human melanomas [1,2], melanotransferrin (MTf) has been reported to be endogenously expressed by various cell types such as intestine and renal epithelial cells, salivary gland duct cells, liver endothelial cells (ECs), chondrocytes and cerebral endothelium [1,3]. To date, two variants of MTf have been identified: one that is secreted in a soluble form (sMTf) and the other that is associated with the cell membrane by a glycosylphosphatidyl inositol anchor (mMTf) [3,4]. Despite its significant homology to members of the transferrin family, MTf was shown to inefficiently transport iron into cells [2,5]. Recently, mMTf has also been reported to act as a key player in cell surface plasminogen binding and in the activation processes involved during cell migration and invasion [6].

The angiogenic process leading to the formation of new capillaries from pre-existing blood vessels is an important step in embryonic development, tissue remodeling, wound healing, tumor growth and metastasis [7-13]. Most of these processes involve a cascade of serine proteinases and metalloproteinases (MMPs). Plasmin, one of the most potent pro-angiogenic factors, is a key element in fibrinolysis, cell migration, tissue remodeling and tumor invasion [14-16]. This major serine proteinase is generated following cleavage of the peptidic bond between Arg<sup>560</sup> and Val<sup>561</sup> of plasminogen by urokinase (u-PA) or tissue-type (t-PA) plasminogen activators [17-20]. Traditionally, the role of t-PA has been considered to be confined to fibrinolysis whereas u-PA has been considered to be an activator of extracellular matrix (ECM) proteolysis [21,22]. However, other studies have suggested a role for t-PA in degradation of the ECM during angiogenesis [23]. Plasmin is involved in the control of cell proliferation [24], apoptosis [21] and [25] and migration [24] during the remodeling of vessel walls. In addition, plasmin can affect the ECM organization through the proteolysis of some components such as fibronectin [26], laminin [27] and [28], proteoglycans [29] as well as fibrin, and through the activation of MMPs [21].

MMPs are produced as latent pro-enzymes and require activation by limited proteolysis to perform their activities. MMPs can be associated with the cell membrane (MT-MMP) or secreted into the extracellular environment [30]. Two particular members of this family which are released by most epithelial and endothelial cells, gelatinases A and B (MMP-2 and MMP-9), are involved in the homeostasis of the ECM [31] and seem to play an

important role in tumor invasion and metastasis [32]. Epithelial and endothelial cells require attachment to the ECM for cell survival [33]. Functional interactions have been described between plasminogen/plasmin and MMP systems, suggesting that both systems cooperate in tissue remodeling [34]. Moreover, MMPs such as pro-MMP-1 [29] and pro-MMP-3 [35] can be activated by plasmin [21,29].

The adhesive glycoprotein fibronectin (Fn) is a central component of the ECM involved in the regulation of adhesion-dependent survival signaling [36]. Fn binds to cell-surface matrix receptors through the Arg–Gly–Asp (RGD) cell binding site [37,38]. Changes in the molecular structure and composition of the Fn matrix may provide new signals for regulating cell shape, migration and proliferation. Modulation of the Fn matrix may therefore be fundamental in the regulation of detachment-induced apoptosis, also called anoikis [37,39,40]. Although recent studies demonstrated little Fn degradation induced by plasmin, they established a strong link between plasmin activity and intact Fn in the material released from endothelial cells (EC) [41].

Several studies show a growing interest in recombinant human soluble MTf (sMTf), which is a C-terminal truncated form of the mMTf generated by the insertion of a stop codon after the Gly<sup>711</sup> residue. These studies indicate that sMTf stimulates plasminogen activation by interacting with the single-chain zymogen pro-urokinase plasminogen activator (pro-uPA) and with plasminogen [42], leading to the inhibition of EC movement and tubulogenesis [43]. Considering these findings, we investigated the potential effect of sMTf on the activation of plasminogen in endothelial cells by the tissular-type plasminogen activator. Our results indicate that sMTf stimulates the formation of plasmin in the presence of t-PA and exogenous glu-plasminogen, the native circulating form of the zymogen, and affects the pericellular environment of endothelial cells by degrading the ECM and activating MMPs.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Human recombinant soluble melanotransferrin (sMTf) was obtained from Biomarin Pharmaceutical (Novato, CA). Rabbit anti-human plasminogen IgG (364R) and glu-plasminogen (400) were purchased from American Diagnostica Inc. (Greenwich, CT). Human tissue plasminogen activator (t-PA) (612200) and GM6001 (364205) were from Calbiochem (La Jolla, CA). (-)-epigallocatechin gallate (EGCg) (E4143) and  $\alpha_2$ -antiplasmin (A8849) from human plasma were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON). Antibodies directed against human MMP-2 (MAB13405) and human fibronectin (F-3648) originated, respectively, from Chemicon International Inc. (Temecula, CA) and Sigma Immuno Chemicals (St. Louis, MO). The plasmin substrate used, VLK-pNA (S-2251), was purchased from Chromogenix (Milan, Italy).

### Cell culture

Human microvascular endothelial cells (HMEC-1) were obtained from the Center for Disease Control and Prevention (Atlanta, GA) and were cultured at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub>/95% air atmosphere in MCDB 131 medium (Sigma-Aldrich) containing 10 mM l-glutamine, 10 ng/mL epidermal growth factor (EGF), 1  $\mu$ g/mL hydrocortisone and 10% inactivated fetal bovine serum (FBS).

### Endothelial cell treatment

HMEC-1 ( $5 \times 10^5$  cells) were seeded onto 6-well culture plates and grown to confluence in complete culture medium for 4 days. Cell treatment was performed for 24 h in the presence of fresh medium supplemented with (or lacking) tissue-type plasminogen activator (t-PA) (4 nM), glu-plasminogen (150 nM or 500 nM) and sMTf (100 nM). The inhibitory effects of  $\alpha_2$ -antiplasmin (150 nM), EGCg (1  $\mu$ M) and GM6001 (10  $\mu$ M) were also investigated. EC were also incubated with an antibody directed against human matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) (20  $\mu$ g/mL). Cells were then washed with a Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-free phosphate saline buffer (PBS) and visualized by phase-contrast microscopy. Pictures were taken at a magnification of 100 $\times$  using a digital Nikon Coolpix™ 5000 camera (Nikon Canada, Mississauga, ON) attached to a Nikon TMS-F microscope (Nikon Canada). Cells were then solubilized in lysis buffer (1% Triton X-100, 0,5% NP-40, 150 mM NaCl, 1 mM



ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA), 10 mM Tris, 2% N-octylglucoside, 1 mM orthovanadate, pH 7.5). Cell media were concentrated 10-fold using an Amicon Ultra-4 10,000 MWCO filter (Millipore Corporation, Bedford, MA). The viability of detached EC was determined by Trypan blue dye exclusion. Cellular detachment was analyzed by encircling the non-cell area in four different photographs using Adobe Photoshop version 8.0 (Adobe Systems Inc., CA) and quantified by calculating the percentage coverage of the selected area compared to non-treated cells using IPLab gel software, Scientific Image Processing 2.0a (Signal Analytics, VA).

#### **Plasmin activity**

Plasmin activity was analyzed by adding 10  $\mu$ L of concentrated conditioned medium to the chromogenic plasmin substrate d-Val-Leu-Arg p-Nitroanilide (VLK-pNA) (15  $\mu$ g/assay) in reaction buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl and 50 mM  $\text{CaCl}_2$ ). The absorbance was monitored at 405 nm over 1 h at 37 °C with a Microplate Thermomax Autoreader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

#### **Western blot analysis**

Conditioned media and cell lysates from HMEC-1 detachment were subjected to SDS-PAGE and separated proteins were transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane (PVDF) (Perkin-Elmer Life Sciences, Boston, MA). Following transfer, immunodetection of plasminogen and fibronectin were performed. Proteins were quantified by laser densitometry using a Chemilmager<sup>TM</sup> 5500 from Alpha Innotech Corporation (San Leandro, CA).

## RESULTS

### **sMTf stimulates plasmin formation**

In light of the importance of sMTf and plasminogen interaction [6,42], we investigated the potential effects of sMTf on the EC plasminogen activation system. Media from cells treated with different combinations of plasminogen, t-PA and sMTf were subjected to Western blot analysis. The activation of plasminogen by t-PA results in the formation of plasmin, which migrates at approximately  $M_r$  50,000 during gel electrophoresis (Fig. 1A). In the absence of treatment, ECs from human microvessels (HMEC-1) easily convert exogenous plasminogen into plasmin, as observed in the first lane of Fig. 1A. The addition of t-PA to the cell medium containing plasminogen leads to complete cleavage of the zymogen into plasmin. Moreover, the addition of sMTf to t-PA significantly increases the formation of plasmin in conditioned medium although the initial plasminogen concentration remained unchanged (Fig. 1A). As previously observed [43], t-PA seems to be a crucial player in this process since sMTf by itself, or combined with plasminogen, does not lead to the formation of plasmin (data not shown). Plasmin activity was also measured in concentrated media by using the conversion rate of VLK-pNA, a chromogenic substrate of plasmin (Fig. 1B). The results indicated that the plasmin observed by Western blot analysis possesses normal proteolytic activity. When sMTf is combined with plasminogen and t-PA, the VLK-pNA hydrolysis by EC is 3-fold higher than in conditioned medium containing only plasminogen and t-PA, and 4-fold higher than in conditioned medium with plasminogen alone. This difference between the levels of plasmin activity with or without sMTf supports the increased levels of plasmin detected in Fig. 1A. It is to note that the presence of a non-specific IgG control did not induce an increase of plasmin activity when added to plasminogen and t-PA, confirming that the effect of sMTf does not results in a protein effect.

### **Degradation of fibronectin by plasmin**

We further investigated whether the higher levels of plasmin generated in the presence of sMTf would affect the structural components of the extracellular matrix (ECM). Since vitronectin (Vn) and fibronectin (Fn) are two important components of the ECM involved in cell spreading and cell attachment [44], their degradation was studied in lysates of EC which had been treated with different concentrations of plasminogen. While

vitronectin was not detected in quiescent nor treated HMEC-1 (data not shown), Western blot analysis showed a 30% reduction of Fn expression in the presence of t-PA, plasminogen and sMTf compared to incubation without sMTf (Fig. 2A). This reduction of Fn suggests that sMTf treatment induces the degradation of Fn by generated plasmin. Interestingly, higher concentrations of plasminogen led to a 45% reduction in Fn detection, while the same experiment performed with 500 nM of sMTf did not induce further changes in Fn expression over 24 h of treatment (data not shown). However, no degradation fragments could be detected by Western blot since the antibody used only recognizes the native Fn conformation. Furthermore, Western blot analysis of medium from HMEC-1 treated with t-PA and sMTf along with two different concentrations of plasminogen indicated 9- and 15-fold specific increases in native Fn (Fig. 2B).

### **Stimulation of EC detachment by plasmin**

Previous studies indicated a strong link between plasmin formation and EC detachment [45,46]. Since our results show that sMTf stimulated the formation of plasmin in the presence of plasminogen and t-PA, we studied whether the plasmin generated could lead to the detachment of HMEC-1. Cell adhesion was studied in the presence of various combinations of glu-plasminogen, t-PA and sMTf. While control cells (Fig. 3A) and cells treated with sMTf (Fig. 3B), t-PA (Fig. 3C) or plasminogen (Fig. 3E) did not show any morphological changes, co-treatment of EC with t-PA and plasminogen (Fig. 3G) induced an incomplete rounding up of the cells after 24 h. Furthermore, the addition of sMTf (Fig. 3H) generated dramatic changes in cell shape leading to subsequent cellular detachment. Interestingly, co-treatment of HMEC-1 with sMTf and t-PA (Fig. 3D) or with sMTf and plasminogen (Fig. 3F) did not alter the adhesive properties of HMEC-1 compared to untreated cells. The EC detachment observed eventually led to cellular death, since no living cells were observed, using trypan blue dye exclusion, among the detached HMEC-1 (data not shown). Quantification of EC detachment in Fig. 3I shows that the addition of sMTf to HMEC-1 exposed to plasminogen and t-PA increased cellular detachment from 10-to 60-fold compared to untreated cells.

### **Modulation of plasmin formation**

In order to demonstrate that plasmin is not the only factor responsible for EC

detachment, HMEC-1 cells were treated with various protease inhibitors known to act on different proteinase systems.  $\alpha_2$ -antiplasmin was demonstrated to prevent plasmin formation and to inhibit the activity of plasmin formed [47,48]. Western blot analysis shows that the addition of  $\alpha_2$ -antiplasmin completely impeded the formation of plasmin in conditioned medium, while neither GM6001 nor epigallocatechin gallate (EGCg) were able to completely prevent plasmin formation (Fig. 4A), although EGCg significantly decreased plasmin formation with a slight signal attributed to plasminogen being detected by Western blotting (Fig. 4A). It has been reported that EGCg inhibits both plasmin and MMP activities whereas GM6001, a broad range MMP inhibitor, does not interfere with plasmin formation. In agreement with Western blot analysis, treatment of ECs with EGCg and  $\alpha_2$ -antiplasmin decreased plasmin activity by 50% and 100%, respectively, compared to cells exposed to t-PA, plasminogen and sMTf (Fig. 4B). Treatment of HMEC-1 with GM6001 did not induce any modulation in the activity of plasmin, which further confirms the specificity of this inhibitor for the MMP activation system.

#### **Effects of various protease inhibitors on EC detachment**

Since EC detachment mediated by sMTf is mainly due to the action of plasmin, which is also known to stimulate the activation of pro-MMPs, the role of MMPs in this process was further examined. The addition of  $\alpha_2$ -antiplasmin and EGCg completely prevented cellular detachment of HMEC-1 while the presence of GM6001 decreased cell detachment by 95% (Fig. 5). These results suggest that MMPs are also involved in EC detachment induced by sMTf.

While several cultured endothelial cells strongly express MMP-1,-2,-3,-9 and-14 [49], HMEC-1 express high levels of MMP-2, while no MMP-9 activity could be detected by zymography (data not shown). An antibody directed against the human form of MMP-2 was used to assess the potential role of this gelatinase in EC detachment. The addition of anti-MMP-2 prevented EC detachment by 93% compared to cells treated with a non-specific IgG<sub>1</sub> antibody (Fig. 5).

## DISCUSSION

The human MTf shows strong homology with the iron transporter named transferrin. Although these proteins possess similar structure, they were demonstrated to own distinct role, notably for iron transport. MTf is known to be either associated to the cell membrane or secreted in the extracellular environment. Previous studies reported that transferrin and MTf could stimulate angiogenesis *in vitro* and *in vivo* [50,51]. However, in these studies, soluble transferrin and recombinant MTf were used either as a chemoattractant during chemotaxis and chemoinvasion assays, or adsorbed on gelatine sponges in chick embryo chorioallantoic membrane assays. The activity of a protein may depend on numerous factors, such as three-dimensional structure. These studies indicate that a MTf gelatine-adsorbed protein will not exert the same properties than the equivalent soluble form. Moreover, a gelatin-adsorbed protein could be considered as non-physiologic conditions. Human and bovine lactoferrin were shown to inhibit tumor-induced angiogenesis [52] and to suppress tumor growth and metastasis in the mouse and rat [53-56]. Recent work from our team demonstrated that the binding of plasminogen to membrane-bound melanotransferrin could favour its conversion into plasmin by plasminogen activator, such as u-PA, located in the vicinity of the cell surface, thereby promoting cell migration and invasion [6]. Our previous results reported that sMTf treatment reduces the regeneration of free and active urokinase plasminogen activator receptor (u-PAR) at the cell surface, by both increasing the internalization of his scavenger receptor the low-density lipoprotein-related protein (LRP) and reducing its protein expression [43]. Considering the importance of plasminogen activation at the cell surface, the modulation of plasmin generation may take an important place in various processes leading to angiogenesis.

Activation of plasminogen, leading to plasmin formation, is associated with extracellular matrix (ECM) degradation as it occurs in blood clot dissolution, tissue remodeling, invasive growth of cancer cells and angiogenesis [57-60]. Plasmin also mediates proteolysis indirectly by the activation of MMPs, which further degrade the ECM. Induction of plasminogen activation leads to EC detachment [45], inhibition of cell adhesion [20] and overstimulation of this system may result in excessive matrix degradation and EC death [61].

Among plasminogen activators, we already demonstrated that sMTf could affect molecular processes involving u-PA-dependent plasminogen activation [43]. Here we

demonstrate that sMTf can also stimulate plasminogen activation by t-PA. Our results suggest that sMTf could protect plasmin against internalization and/or degradation, notably at the kringle domain level. Regulation of both the plasmin activity and the conversion of plasminogen into plasmin are critical to avoid inappropriate tissue damage and proteolysis of the ECM. Various mechanisms are known to be involved in the regulation of plasmin activity. The physiological inhibitor of plasmin,  $\alpha_2$ -antiplasmin, rapidly inactivates fluid-phase plasmin by forming a tight complex with the proteinase [62-64]. Activated MMPs can also digest and inactivate plasmin [65]. In addition, plasmin is capable of autoproteolysis [66], which can be retarded by fibrinogen and  $\epsilon$ -aminocaproic acid [67,68]. Although recent work from our laboratory has established that plasminogen strongly interacts with immobilized sMTf [42], further studies are needed to clarify the molecular mechanism by which sMTf could facilitate plasminogen activation, delay plasmin degradation and allow further activation of plasminogen and pro-MMPs.

Under pathological conditions, plasmin could be generated in situ at the cell surface and be responsible for inducing anoikis by degrading pericellular adhesive glycoproteins such as fibronectin, vitronectin or laminin, which participate in cell anchorage and survival signaling. Anoikis is a form of apoptosis induced by detachment of adherent cells from the ECM [69]. Fibronectin is known to regulate adhesion-dependent survival signaling [36] and to play an important role in several cellular processes including adhesion, migration, differentiation and growth [44]. A recent study reported that high levels of plasmin caused a significant decrease of intact Fn in EC, but also a concomitant increase of intact Fn in the cell medium [41]. The reduction of Fn detection in HMEC-1 cells treated with plasminogen, t-PA and sMTf in the present study may result from significant cleavage by plasmin since detection of intact Fn is increased in the corresponding cell media. Higher levels of plasmin generated in the presence of sMTf could greatly affect the ECM components and thus decrease cell anchorage to the ECM. Furthermore, modulation of the Fn matrix is fundamental in the regulation of detachment-induced apoptosis [37,39,40]. Similar results have been reported, where amyloid endostatin, a co-factor for t-PA-mediated plasminogen activation, induced endothelial cell-mediated plasmin formation resulting in vitronectin degradation, cell remodeling and detachment [70,71]. Therefore, we suggest that sMTf acts through a similar mechanism on the Fn matrix.

We further investigated other players downstream to plasmin that may be implicated in the molecular events triggered by sMTf. Members of the MMP family are crucial in ECM and basement membrane degradation during angiogenesis. It has already been reported that EC detachment could be plasmin-dependent, without stimulating the MMP activation system [70]. Therefore, the authors stipulated that the plasmin generated might not be sufficient to induce the activation of pro-MMPs. In contrast, our results show that sMTf stimulates plasminogen activation by t-PA in a manner sufficient to induce the activation of pro-MMPs, considering that EGCg and GM6001 are both capable of preventing HMEC-1 detachment. Since MMPs seem to play an important role in the EC detachment induced by sMTf, we sought to identify the involvement of a specific proteinase. Our data from experiments done on quiescent HMEC-1 cells show that these cells constitutively and predominantly express MMP-2. Although the role of plasmin in the activation of pro-MMP-2 remains unclear, several reports have demonstrated that plasmin can activate pro-MMP-2 in the presence of MT1-MMP [72-75]. Furthermore, the activation of MMP-2 was reported to be stimulated in human umbilical EC (HUVEC) during apoptosis [76]. Since treatment of HMEC-1 with a specific antibody directed against MMP-2 prevented cellular detachment, we suggest that MMP-2 activity strongly contributes to local digestion of the ECM and, eventually, of the Fn matrix. Consequently, the presence of sMTf in cell culture medium conducts to more efficient formation of plasmin and stimulates the activity of MMP-2, leading to increased Fn matrix degradation and finally subsequent endothelial cell death following major cellular remodeling and detachment from the ECM.

Although the activity of t-PA was conventionally associated with fibrinolysis [21], recent work suggested a role in ECM degradation during angiogenesis [23]. Furthermore, numerous studies have revealed high levels of t-PA expression in several human tumors [77-81], associated with good prognosis in cancer patients [82-84]. We report here that overstimulation of the plasminogen activation system by sMTf leads to major detachment of endothelial cells. Since t-PA expression by EC is induced by angiogenic factors, including basic fibroblast growth factor (bFGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) [85], EC detachment and subsequent cell death should play an important role in the angiogenic process. In fact, therapeutic administration of sMTf may result in the stimulation of plasminogen activation by t-PA produced in the tumor and interfere in EC proliferation and

survival.

Taken together, overstimulation of the plasminogen activation system locally by agents such as sMTf may result in excessive matrix degradation and endothelial cell death, thereby preventing angiogenesis and tumor growth [71]. Although we have previously demonstrated that sMTf reduces HMEC-1 capacity to generate plasmin from plasminogen by disturbing the u-PAR/LRP plasminolytic system, the results shown here indicate that, under specific conditions, such as an angiogenic environment, sMTf may lead to EC detachment. These findings constitute a novel pathway for interference in tumor growth and show interesting therapeutic applications for human recombinant melanotransferrin.

### **Acknowledgements**

We thank Dr Anthony Regina and Dr Denis Gingras for their critical reading of this manuscript. This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada to R.Béliveau.



## REFERENCES

- [1] J.P. Brown, R.G. Woodbury, C.E. Hart, I. Hellstrom and K.E. Hellstrom, Quantitative analysis of melanoma-associated antigen p97 in normal and neoplastic tissues, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78** (1981), pp. 539–543.
- [2] J.P. Brown, R.M. Hewick and I. Hellstrom *et al.*, Human melanoma-associated antigen p97 is structurally and functionally related to transferrin, *Nature* **296** (1982), pp. 171–173.
- [3] R. Alemany, M.R. Vila and C. Franci *et al.*, Glycosyl phosphatidylinositol membrane anchoring of melanotransferrin (p97): apical compartmentalization in intestinal epithelial cells, *J. Cell Sci.* **104** (1993) (Pt. 4), pp. 1155–1162.
- [4] M.R. Food, S. Rothenberger and R. Gabathuler *et al.*, Transport and expression in human melanomas of a transferrin-like glycosylphosphatidylinositol-anchored protein, *J. Biol. Chem.* **269** (1994), pp. 3034–3040.
- [5] D.R. Richardson, The role of the membrane-bound tumour antigen, melanotransferrin (p97), in iron uptake by the human malignant melanoma cell, *Eur. J. Biochem.* **267** (2000), pp. 1290–1298.
- [6] J. Michaud-Levesque, M. Demeule and R. Beliveau, Stimulation of cell surface plasminogen activation by membrane-bound melanotransferrin: a key phenomenon for cell invasion, *Exp. Cell Res.* **308** (2005) (2), pp. 479–490.
- [7] L.F. Brown, M. Detmar and K. Claffey *et al.*, Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine, *EXS* **79** (1997), pp. 233–269.
- [8] P. Carmeliet, Angiogenesis in health and disease, *Nat. Med.* **9** (2003), pp. 653–660.
- [9] H.F. Dvorak, Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy, *J. Clin. Oncol.* **20** (2002), pp. 4368–4380.
- [10] H.F. Dvorak, Rous-Whipple Award Lecture. How tumors make bad blood vessels and stroma, *Am. J. Pathol.* **162** (2003), pp. 1747–1757.
- [11] H.F. Dvorak, J.A. Nagy, D. Feng, L.F. Brown and A.M. Dvorak, Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **237** (1999), pp. 97–132.
- [12] N. Ferrara, H.P. Gerber and J. LeCouter, The biology of VEGF and its receptors, *Nat.*

*Med.* **9** (2003), pp. 669–676.

[13] J. Folkman, Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis, *Semin. Oncol.* **29** (2002), pp. 15–18.

[14] F.J. Castellino and V.A. Ploplis, Structure and function of the plasminogen/plasmin system, *Thromb. Haemostasis* **93** (2005), pp. 647–654.

[15] P.A. Andreasen, L.S. Nielsen and J. Grondahl-Hansen *et al.*, Inactive proenzyme to tissue-type plasminogen activator from human melanoma cells, identified after affinity purification with a monoclonal antibody, *EMBO J.* **3** (1984), pp. 51–56.

[16] G. Markus, The relevance of plasminogen activators to neoplastic growth, A review of recent literature, *Enzyme* **40** (1988), pp. 158–172.

[17] T.L. Moser, M.S. Stack, M.L. Wahl and S.V. Pizzo, The mechanism of action of angiostatin: can you teach an old dog new tricks?, *Thromb. Haemostasis* **87** (2002), pp. 394–401.

[18] Y.V. Parfyonova, O.S. Plekhanova and V.A. Tkachuk, Plasminogen activators in vascular remodeling and angiogenesis, *Biochemistry* **67** (2002), pp. 119–134 (Mosc).

[19] J.D. Vassalli and M.S. Pepper, Tumour biology, Membrane proteases in focus, *Nature* **370** (1994), pp. 14–15.

[20] J. Reinartz, B. Schafer, R. Batrla, C.E. Klein and M.D. Kramer, Plasmin abrogates alpha v beta 5-mediated adhesion of a human keratinocyte cell line (HaCaT) to vitronectin, *Exp. Cell Res.* **220** (1995), pp. 274–282.

[21] P. Carmeliet, L. Moons and R. Lijnen *et al.*, Urokinase-generated plasmin activates matrix metalloproteinases during aneurysm formation, *Nat. Genet.* **17** (1997), pp. 439–444.

[22] P. Carmeliet and D. Collen, Development and disease in proteinase-deficient mice: role of the plasminogen, matrix metalloproteinase and coagulation system, *Thromb. Res.* **91** (1998), pp. 255–285.

[23] Y. Sato, K. Okamura and A. Morimoto *et al.*, Indispensable role of tissue-type plasminogen activator in growth factor-dependent tube formation of human microvascular endothelial cells *in vitro*, *Exp. Cell Res.* **204** (1993), pp. 223–229.

[24] J.M. Herbert, I. Lamarche and P. Carmeliet, Urokinase and tissue-type plasminogen activator are required for the mitogenic and chemotactic effects of bovine fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor-BB for vascular smooth muscle cells, *J. Biol. Chem.*

272 (1997), pp. 23585–23591.

[25] J.M. Herbert and P. Carmeliet, Involvement of u-PA in the anti-apoptotic activity of TGFbeta for vascular smooth muscle cells, *FEBS Lett.* **413** (1997), pp. 401–404.

[26] L.A. Liotta, R.H. Goldfarb and R. Brundage *et al.*, Effect of plasminogen activator (urokinase), plasmin, and thrombin on glycoprotein and collagenous components of basement membrane, *Cancer Res.* **41** (1981), pp. 4629–4636.

[27] O. Saksela, Plasminogen activation and regulation of pericellular proteolysis, *Biochim. Biophys. Acta* **823** (1985), pp. 35–65.

[28] C.S. He, S.M. Wilhelm and A.P. Pentland *et al.*, Tissue cooperation in a proteolytic cascade activating human interstitial collagenase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86** (1989), pp. 2632–2636.

[29] E. Mochan and T. Keler, Plasmin degradation of cartilage proteoglycan, *Biochim. Biophys. Acta* **800** (1984), pp. 312–315.

[30] M.S. Pepper, Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **21** (2001), pp. 1104–1117.

[31] M.A. Forget, R.R. Desrosiers and R. Beliveau, Physiological roles of matrix metalloproteinases: implications for tumor growth and metastasis, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **77** (1999), pp. 465–480.

[32] D.E. Kleiner and W.G. Stetler-Stevenson, Matrix metalloproteinases and metastasis, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **43** (1999), pp. S42–S51 (Suppl.).

[33] S.M. Frisch and H. Francis, Disruption of epithelial cell–matrix interactions induces apoptosis, *J. Cell Biol.* **124** (1994), pp. 619–626.

[34] X. Houard, C. Monnot, V. Dive, P. Corvol and M. Pagano, Vascular smooth muscle cells efficiently activate a new proteinase cascade involving plasminogen and fibronectin, *J. Cell. Biochem.* **88** (2003), pp. 1188–1201.

[35] H. Nagase, J.J. Enghild, K. Suzuki and G. Salvesen, Stepwise activation mechanisms of the precursor of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) by proteinases and (4-aminophenyl)mercuric acetate, *Biochemistry* **29** (1990), pp. 5783–5789.

[36] J.L. Sechler and J.E. Schwarzbauer, Control of cell cycle progression by fibronectin matrix architecture, *J. Biol. Chem.* **273** (1998), pp. 25533–25536.

[37] H.L. Hadden and C.A. Henke, Induction of lung fibroblast apoptosis by soluble

fibronectin peptides, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **162** (2000), pp. 1553–1560.

[38] C.D. Buckley, D. Pilling and N.V. Henriquez *et al.*, RGD peptides induce apoptosis by direct caspase-3 activation, *Nature* **397** (1999), pp. 534–539.

[39] E.A. Verderio, D. Telci, A. Okoye, G. Melino and M. Griffin, A novel RGD-independent cell adhesion pathway mediated by fibronectin-bound tissue transglutaminase rescues cells from anoikis, *J. Biol. Chem.* **278** (2003), pp. 42604–42614.

[40] J. Jeong, I. Han and Y. Lim *et al.*, Rat embryo fibroblasts require both the cell-binding and the heparin-binding domains of fibronectin for survival, *Biochem. J.* **356** (2001), pp. 531–537.

[41] A. Bonnefoy and C. Legrand, Proteolysis of subendothelial adhesive glycoproteins (fibronectin, thrombospondin, and von Willebrand factor) by plasmin, leukocyte cathepsin G, and elastase, *Thromb. Res.* **98** (2000), pp. 323–332.

[42] M. Demeule, Y. Bertrand and J. Michaud-Levesque *et al.*, Regulation of plasminogen activation: a role for melanotransferrin (p97) in cell migration, *Blood* **102** (2003), pp. 1723–1731.

[43] J. Michaud-Levesque, Y. Rolland, M. Demeule, Y. Bertrand and R. Beliveau, Inhibition of endothelial cell movement and tubulogenesis by human recombinant soluble melanotransferrin: involvement of the u-PAR/LRP plasminolytic system, *Biochim. Biophys. Acta* **1743** (2005), pp. 243–253.

[44] J.L. Guan and R.O. Hynes, Lymphoid cells recognize an alternatively spliced segment of fibronectin via the integrin receptor alpha 4 beta 1, *Cell* **60** (1990), pp. 53–61.

[45] M. Ge, G. Tang, T.J. Ryan and A.B. Malik, Fibrinogen degradation product fragment D induces endothelial cell detachment by activation of cell-mediated fibrinolysis, *J. Clin. Invest.* **90** (1992), pp. 2508–2516.

[46] G.E. Davis, K.A. Pinter-Allen, R. Salazar and S.A. Maxwell, Matrix metalloproteinase-1 and-9 activation by plasmin regulates a novel endothelial cell-mediated mechanism of collagen gel contraction and capillary tube regression in three-dimensional collagen matrices, *J. Cell Sci.* **114** (2001), pp. 917–930.

[47] M. Levi, D. Roem and A.M. Kamp *et al.*, Assessment of the relative contribution of different protease inhibitors to the inhibition of plasmin in vivo, *Thromb. Haemostasis* **69** (1993), pp. 141–146.

- [48] T. Syrovets and T. Simmet, Novel aspects and new roles for the serine protease plasmin, *Cell Mol. Life Sci.* **61** (2004), pp. 873–885.
- [49] M.A. Moses, The regulation of neovascularization of matrix metalloproteinases and their inhibitors, *Stem Cells* **15** (1997), pp. 180–189.
- [50] M.F. Carlevaro, A. Albini and D. Ribatti *et al.*, Transferrin promotes endothelial cell migration and invasion: implication in cartilage neovascularization, *J. Cell Biol.* **136** (1997), pp. 1375–1384.
- [51] R. Sala, W.A. Jefferies and B. Walker *et al.*, The human melanoma associated protein melanotransferrin promotes endothelial cell migration and angiogenesis in vivo, *Eur. J. Cell Biol.* **81** (2002), pp. 599–607.
- [52] M. Shimamura, Y. Yamamoto and H. Ashino *et al.*, Bovine lactoferrin inhibits tumor-induced angiogenesis, *Int. J. Cancer* **111** (2004), pp. 111–116.
- [53] J. Bezault, R. Bhimani, J. Wiprovnick and P. Furmanski, Human lactoferrin inhibits growth of solid tumors and development of experimental metastases in mice, *Cancer Res.* **54** (1994), pp. 2310–2312.
- [54] Y.C. Yoo, S. Watanabe and R. Watanabe *et al.*, Bovine lactoferrin and lactoferricin, a peptide derived from bovine lactoferrin, inhibit tumor metastasis in mice, *Jpn. J. Cancer Res.* **88** (1997), pp. 184–190.
- [55] M. Iigo, T. Kuhara and Y. Ushida *et al.*, Inhibitory effects of bovine lactoferrin on colon carcinoma 26 lung metastasis in mice, *Clin. Exp. Metastasis* **17** (1999), pp. 35–40.
- [56] K. Norrby, I. Mattsby-Baltzer, M. Innocenti and S. Tuneberg, Orally administered bovine lactoferrin systemically inhibits VEGF(165)-mediated angiogenesis in the rat, *Int. J. Cancer* **91** (2001), pp. 236–240.
- [57] M.J. Duffy, Plasminogen activators and cancer, *Blood Coagul. Fibrinolysis* **1** (1990), pp. 681–687.
- [58] M.D. Kramer, J. Reinartz, G. Brunner and V. Schirmacher, Plasmin in pericellular proteolysis and cellular invasion, *Invasion Metastasis* **14** (1994), pp. 210–222.
- [59] G. Pintucci, A. Bikfalvi, S. Klein and D.B. Rifkin, Angiogenesis and the fibrinolytic system, *Semin. Thromb. Hemostasis* **22** (1996), pp. 517–524.
- [60] W.R. Bell, The fibrinolytic system in neoplasia, *Semin. Thromb. Hemostasis* **22** (1996), pp. 459–478.

- [61] M. Sugimura, H. Kobayashi and T. Terao, Plasmin modulators, aprotinin and anti-catalytic plasmin antibody, efficiently inhibit destruction of bovine vascular endothelial cells by choriocarcinoma cells, *Gynecol. Oncol.* **52** (1994), pp. 337–346.
- [62] I. Rakoczi, B. Wiman and D. Collen, On the biological significance of the specific interaction between fibrin, plasminogen and antiplasmin, *Biochim. Biophys. Acta* **540** (1978), pp. 295–300.
- [63] D. Rouy and E. Angles-Cano, The mechanism of activation of plasminogen at the fibrin surface by tissue-type plasminogen activator in a plasma milieu *in vitro*, Role of alpha 2-antiplasmin, *Biochem. J.* **271** (1990), pp. 51–57.
- [64] C. Longstaff and P.J. Gaffney, Serpin-serine protease binding kinetics: alpha 2-antiplasmin as a model inhibitor, *Biochemistry* **30** (1991), pp. 979–986.
- [65] R. Mazzieri, L. Masiero and L. Zanetta *et al.*, Control of type IV collagenase activity by components of the urokinase-plasmin system: a regulatory mechanism with cell-bound reactants, *EMBO J.* **16** (1997), pp. 2319–2332.
- [66] J. Jespersen, J. Gram and T. Astrup, The autodigestion of human plasmin follows a bimolecular mode of reaction subject to product inhibition, *Thromb. Res.* **41** (1986), pp. 395–404.
- [67] P.J. Gaffney, Fibrin(-ogen) interactions with plasmin, *Haemostasis* **6** (1977), pp. 2–25.
- [68] M. Grimard, Evidence for high-molecular weight active peptides originating from porcine plasmin autolysis, *Biochimie* **58** (1976), pp. 1409–1412.
- [69] O. Meilhac, B. Ho-Tin-Noe and X. Houard *et al.*, Pericellular plasmin induces smooth muscle cell anoikis, *FASEB J.* **17** (2003), pp. 1301–1303.
- [70] A. Reijerkerk, L.O. Mosnier and O. Kranenburg *et al.*, Amyloid endostatin induces endothelial cell detachment by stimulation of the plasminogen activation system, *Mol. Cancer Res.* **1** (2003), pp. 561–568.
- [71] A. Reijerkerk, E.E. Voest and M.F. Gebbink, No grip, no growth: the conceptual basis of excessive proteolysis in the treatment of cancer, *Eur. J. Cancer.* **36** (2000), pp. 1695–1705.
- [72] S. Monea, K. Lehti, J. Keski-Oja and P. Mignatti, Plasmin activates pro-matrix metalloproteinase-2 with a membrane-type 1 matrix metalloproteinase-dependent mechanism, *J. Cell. Physiol.* **192** (2002), pp. 160–170.
- [73] Y. Okumura, H. Sato, M. Seiki and H. Kido, Proteolytic activation of the precursor of

membrane type 1 matrix metalloproteinase by human plasmin, A possible cell surface activator, *FEBS Lett.* **402** (1997), pp. 181–184.

[74] E.N. Baramova, K. Bajou and A. Remacle *et al.*, Involvement of PA/plasmin system in the processing of pro-MMP-9 and in the second step of pro-MMP-2 activation, *FEBS Lett.* **405** (1997), pp. 157–162.

[75] A. Takano, A. Hirata and Y. Inomata *et al.*, Intravitreal plasmin injection activates endogenous matrix metalloproteinase-2 in rabbit and human vitreous, *Am. J. Ophthalmol.* (2005).

[76] B. Levkau, R.D. Kenagy and A. Karsan *et al.*, Activation of metalloproteinases and their association with integrins: an auxiliary apoptotic pathway in human endothelial cells, *Cell Death Differ.* **9** (2002), pp. 1360–1367.

[77] G. De Petro, D. Tavian and A. Copeta *et al.*, Expression of urokinase-type plasminogen activator (u-PA), u-PA receptor, and tissue-type PA messenger RNAs in human hepatocellular carcinoma, *Cancer Res.* **58** (1998), pp. 2234–2239.

[78] M. Lindgren, M. Johansson and J. Sandstrom *et al.*, VEGF and tPA co-expressed in malignant glioma, *Acta Oncol.* **36** (1997), pp. 615–618.

[79] C. Hackel, B. Czerniak, A.G. Ayala, K. Radig and A. Roessner, Expression of plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor 1 in dedifferentiated chondrosarcoma, *Cancer* **79** (1997), pp. 53–58.

[80] J.C. Gris, J.F. Schved, C. Marty-Double, J.M. Mauboussin and P. Balmes, Immunohistochemical study of tumor cell-associated plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors in lung carcinomas, *Chest* **104** (1993), pp. 8–13.

[81] J. Yamashita, K. Inada and S. Yamashita *et al.*, Tissue-type plasminogen activator is involved in skeletal metastasis from human breast cancer, *Int. J. Clin. Lab. Res.* **21** (1992), pp. 227–230.

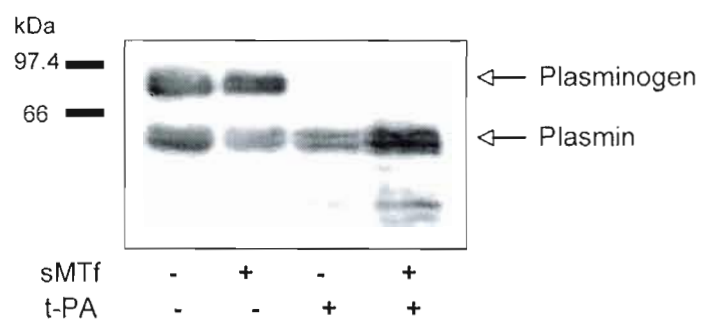
[82] J.H. de-Witte, C.G. Sweep and J.G. Klijn *et al.*, Prognostic value of tissue-type plasminogen activator (tPA) and its complex with the type-1 inhibitor (PAI-1) in breast cancer, *Br. J. Cancer* **80** (1999), pp. 286–294.

[83] N. Grebenshikov, A. Geurts-Moespot and H. De Witte *et al.*, A sensitive and robust assay for urokinase and tissue-type plasminogen activators (uPA and tPA) and their inhibitor type I (PAI-1) in breast tumor cytosols, *Int. J. Biol. Markers* **12** (1997), pp. 6–14.

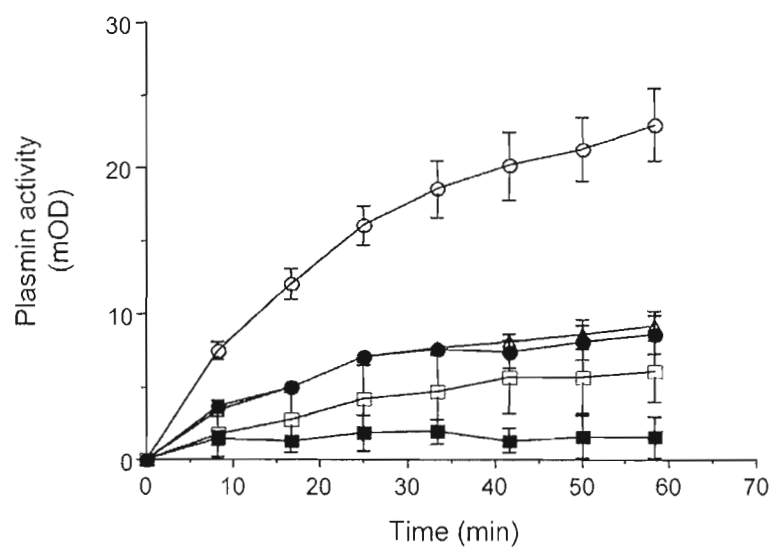
- [84] S.J. Kim, E. Shiba and T. Kobayashi *et al.*, Prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator (PA), PA inhibitor type-1, and tissue-type PA antigen levels in node-negative breast cancer: a prospective study on multicenter basis, *Clin. Cancer Res.* **4** (1998), pp. 177–182.
- [85] M.S. Pepper, N. Ferrara, L. Orci and R. Montesano, Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **181** (1991), pp. 902–906.



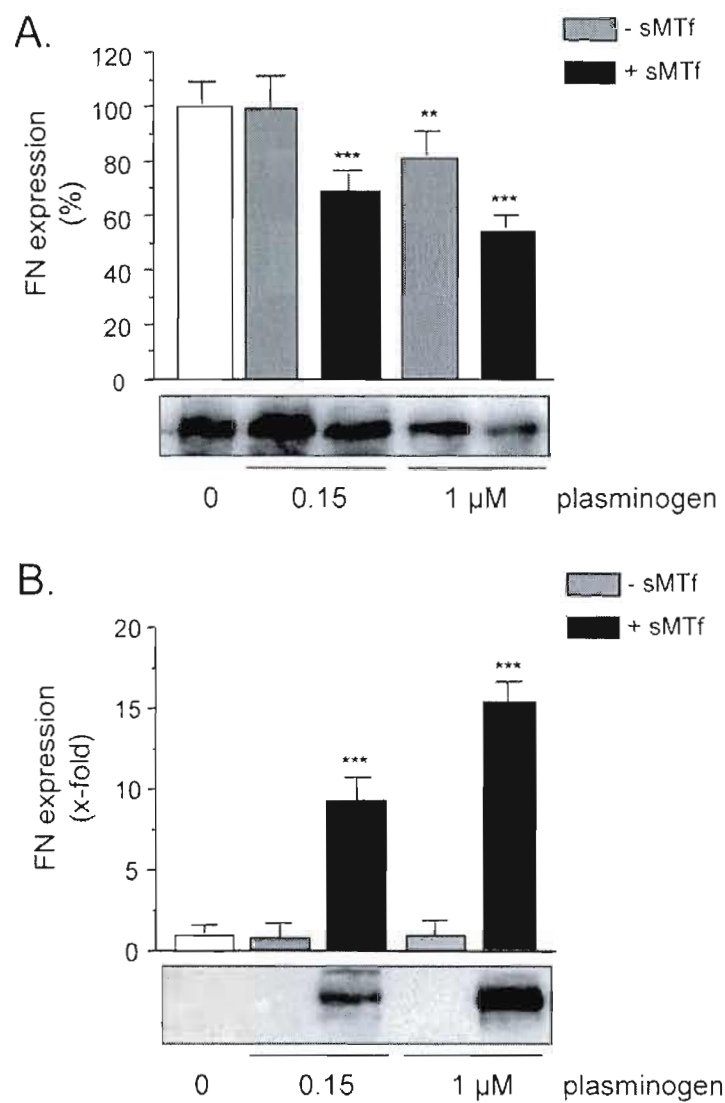
A.



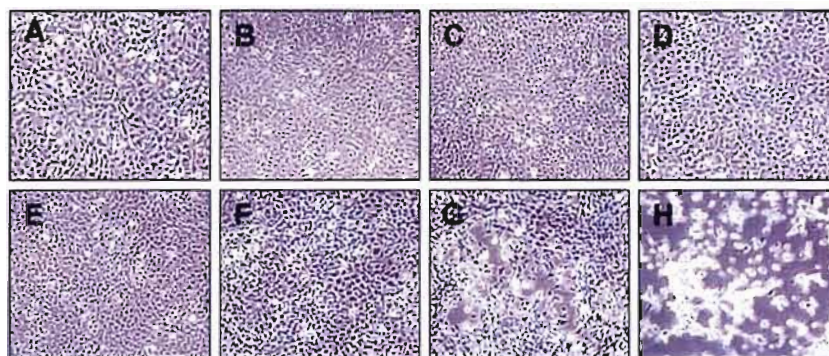
B.



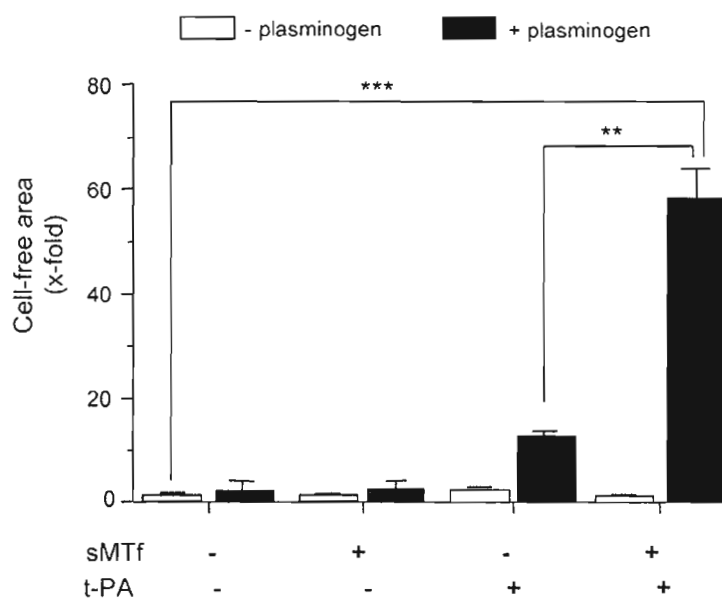
**Figure 1** sMTf treatment triggers plasmin formation in HMEC-1.



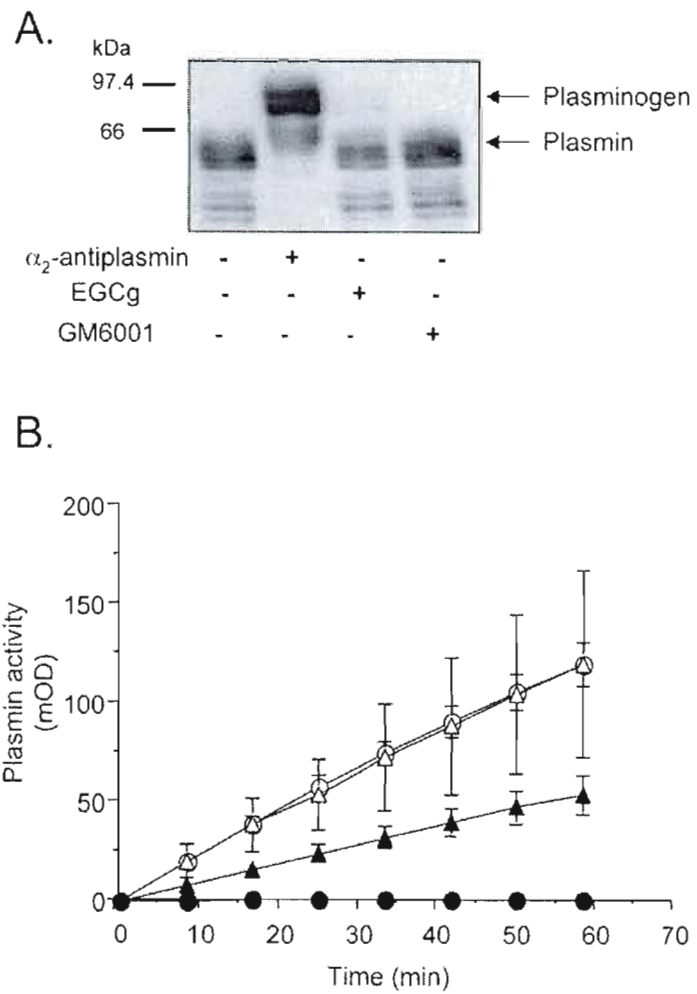
**Figure 2.** Increase of plasmin formation by sMTf leads to the degradation of fibronectin.



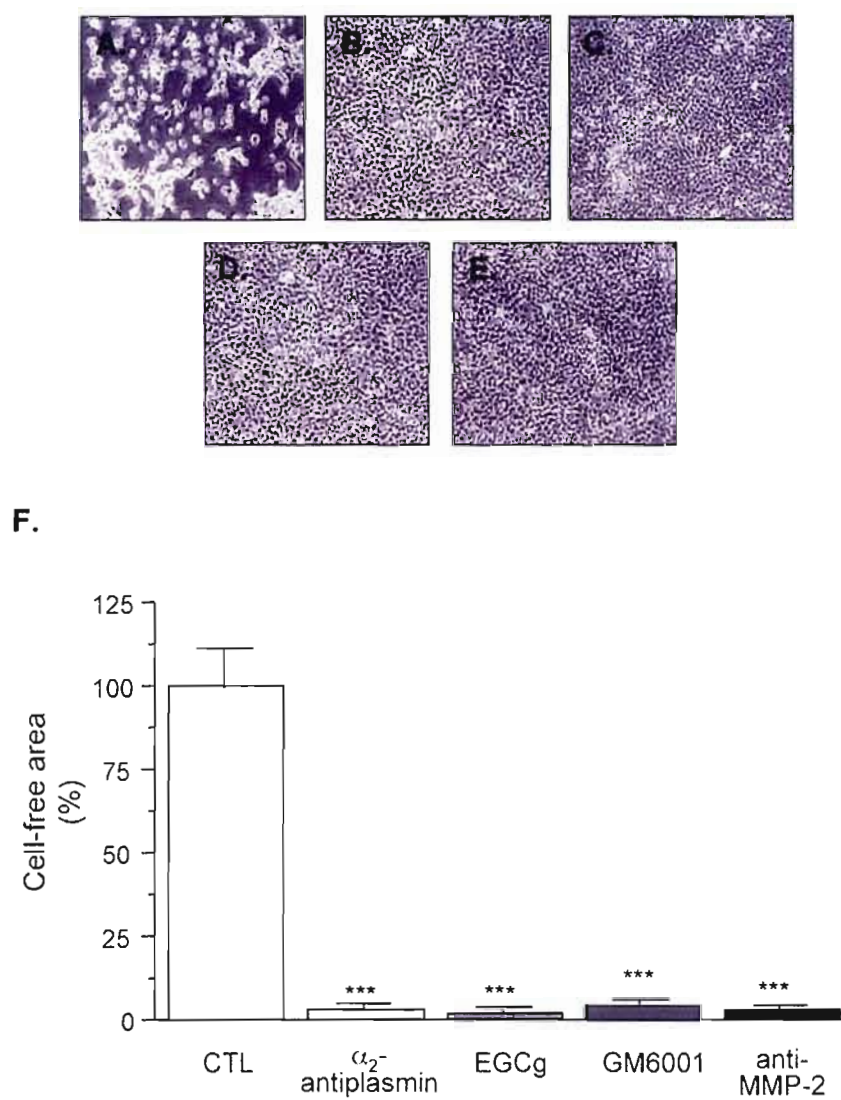
I.



**Figure 3.** Higher levels of plasmin induce endothelial cell detachment.



**Figure 4.** Modulation of plasminogen activation by various inhibitors.



**Figure 5.** The MMP activation system is a key player in EC detachment.

## CONTRIBUTION DE L'AUTEUR PRINCIPAL ET DES CO-AUTEURS

**Note : Seul l'auteur principal peut utiliser l'article mentionné ci-dessous pour sa thèse. Aucune autre personne, incluant les autres co-premiers auteurs le cas échéant, ne pourra utiliser l'article dans une thèse ou un mémoire.**

Description du rôle de chacun des auteurs en commençant par l'auteur principal : tâches et responsabilité spécifiques, nature de la contribution à l'article (rédaction, expérimentation, figures, recherche bibliographique, etc.)

Yannève Rolland a effectué la recherche bibliographique, réalisé la totalité des expérimentations (à l'exception de la Figure 1B-C), analysé les résultats et écrit le manuscrit.

Le Dr. Michel Demeule a supervisé l'élaboration du plan expérimental relié à cet article. De plus, il a contribué à l'évaluation critique du manuscrit.

Jonathan Michaud Lévesque a réalisé la partie expérimentale présentée en Figure 1B-C.

En tant que directeur de thèse, le Dr. Richard Béliveau a fourni l'encadrement professionnel, intellectuel et technique nécessaire à la réalisation de cet article.

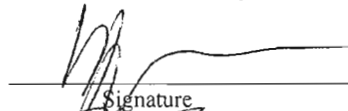
## ATTESTATION DE L'AUTEUR PRINCIPAL ET DU DIRECTEUR DE RECHERCHE

L'auteur principal de l'article intitulé :

**Inhibition of tumor growth by a truncated and soluble form of melanotransferrin.**

soumis pour publication , accepté pour publication , ou publié ✓ dans : Experimental Cell Research  
est :

Auteur principal Yannève Rolland  
Nom

  
Signature

27-06-2008  
Date

Directeur de recherche Richard Béliveau  
Nom

  
Signature

27/06/08  
Date

**ACCEPTATION DES CO-AUTEURS POUR L'UTILISATION  
D'UN ARTICLE DANS UNE THÈSE**

**Note :** Seul l'auteur principal peut utiliser l'article mentionné ci-dessous pour sa thèse. Aucune autre personne, incluant les autres co-premiers auteurs le cas échéant, ne pourra utiliser l'article dans une thèse ou un mémoire.

Nous entérinons que Yannève Rolland

est l'auteur principal de l'article intitulé

**Inhibition of tumor growth by a truncated and soluble form of melanotransferrin.**

et qu'il peut l'utiliser pour sa thèse

Co-auteur(s)

1) Demeule, Michel  
Nom, prénom

  
Signature


27 juin 08  
Date

2) Michaud-Levesque, Jonathan  
Nom, prénom

  
Signature

2008/07/02  
Date

3) Béliveau, Richard  
Nom, prénom

  
Signature

27/06/08  
Date

## 2.2 Inhibition of tumor growth by a truncated and soluble form of melanotransferrin

Yannève Rolland, Michel Demeule, Jonathan Michaud-Levesque and Richard Béliveau\*

*Laboratoire de Médecine Moléculaire, Service d'Hémo-Oncologie, Hôpital Ste-Justine-  
Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8.*

**Corresponding author\*:** Richard Béliveau, Laboratoire de Médecine Moléculaire, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succursale Centre-ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8. Fax : 1-514-987-0246. email : [oncomol@nobel.si.uqam.ca](mailto:oncomol@nobel.si.uqam.ca)



## RÉSUMÉ

La mélanotransferrine (MTf) est une glycoprotéine exprimée majoritairement à la membrane plasmique des mélanomes. Il a été démontré qu'une forme recombinante tronquée de la MTf (sMTf) possédait des propriétés anti-angiogéniques *in vitro*. Dans cette étude, nous démontrons que l'administration de sMTf réduit de moitié la néovascularisation d'implants de Matrigel stimulée par les facteurs de croissance. De plus, cette protéine inhibe significativement la croissance de tumeurs sous-cutanées dérivées de glioblastome (U-87 MG) et de carcinome pulmonaire (NCI-H460) à des doses de 2,5 et 10 mg/kg/jour. Par ailleurs, les tumeurs des animaux traités à la dose la plus élevée de sMTf présentent une croissance peu importante tout au long de l'étude. Nos résultats indiquent que la sMTf ciblerait l'angiogenèse en réduisant les niveaux d'hémoglobine et d'endogline au sein des tumeurs de glioblastomes. La sMTf réduit la motilité des cellules NCI-H460 exprimant des niveaux considérables de MTf membranaire. Les résultats présentés dans cette étude démontrent que la sMTf possède des caractéristiques anti-angiogéniques et anti-tumorales, suggérant ainsi de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le traitement du cancer.

## ABSTRACT

Melanotransferrin is a glycoprotein expressed at the cell membrane and secreted in the extracellular environment. Recombinant truncated form of membrane-bound melanotransferrin (sMTf) was reported to exert *in vitro* anti-angiogenic properties. Here we show that sMTf treatment leads to a 50% inhibition of neovascularization in Matrigel<sup>TM</sup> implants when stimulated by growth factors. Using a glioblastoma xenograft model, we demonstrate that sMTf delivery at 2.5 and 10 mg/kg/day by micro-osmotic pump inhibits tumor growth by 73% and 91% respectively. In a lung carcinoma xenograft model, sMTf treatment at 2.5 and 10 mg/kg/day impeded tumor growth by 87% and 97%. Furthermore, subcutaneous glioblastoma and lung carcinoma tumors from mice treated with 10 mg/kg/day of sMTf present insignificant growth toward the study. In association with a reduction in endoglin mRNA expression, the hemoglobin content decreased by half in sMTf-treated glioblastoma tumors. *In vitro* experiments revealed that NCI-H460 cells treated with sMTf display an inhibition in their invasive capabilities with a concomitant reduction in the expression of the low-density lipoprotein receptor protein and urokinase plasminogen activator receptor. Altogether, our results demonstrate that sMTf exerts anti-cancer and anti-angiogenic activities, suggesting that its administration may provide novel therapeutic strategies for the treatment of cancer.

**Keywords:** Glioblastoma; large cell lung carcinoma; angiogenesis; melanotransferrin; low-density lipoprotein receptor-related protein; urokinase plasminogen activator receptor.

## INTRODUCTION

First identified in human melanoma, melanotransferrin (MTf) is a glycosylated protein that was found to play an important role in numerous processes associated with tumor development and angiogenesis [1-4]. Currently, two distinct forms of MTf have been identified, either associated to the cell membrane by a glycosyl phosphatidylinositol anchor (mMTf) or secreted into the extracellular environment. While the secreted form of MTf is present at relatively low concentrations in human plasma (33 pM) [5], mMTf is reported to be expressed in many tissues and cell lines [6-8]. In a previous study, mMTf was reported to bind plasminogen and facilitate its conversion into plasmin at the cell surface leading to an increase in the motility, migration and invasion of Chinese hamster ovary cells overexpressing MTf [4]. Moreover, it was recently demonstrated that down-regulation of MTf mRNA by post-transcriptional gene silencing in SK-Mel-28 melanoma cells resulted in the inhibition of proliferation, migration, tumor growth and metastasis [9,10]. A recombinant truncated form of mMTf (sMTf) was proposed to exert anti-angiogenic properties since it reduces endothelial cell (EC) migration and capillary-like structures formation by interacting with the plasminogen activation system [1,2,11]. Altogether, these results suggest the involvement of an important balance between mMTf and sMTf in various mechanisms related to plasminogen activation.

Of all malignancies, lung cancer is the leading cause of cancer-related mortality [12]. Of newly diagnosed patients with lung cancer, 75–80% are defined as non-small cell lung carcinoma (NSCLC) and roughly 20% as small-cell lung cancer. According to the National Cancer Institute, NSCLC can be divided in three subtypes: squamous cell carcinoma, adenocarcinoma and large lung carcinoma. Recent clinical trials have demonstrated that the benefit of combined chemotherapy among the fittest patients with advanced NSCLC is marginal and that only patients who undergo curative surgery have a significant potential for cure [13]. Another type of cancer much less frequent but reaching over 18,000 new cases per year in the U.S. is multiform glioblastoma [14]. Although these tumors are resistant to both radiotherapy and chemotherapy, the established treatment for patients diagnosed with malignant gliomas currently involves a combination of surgery, radiation and chemotherapy [15]. Thus, novel treatment strategies are needed to improve the clinical management of these

diseases.

Tumor growth over 1–3 mm<sup>3</sup> requires the development of newly formed vessels from pre-existing vasculature [16,17]. The angiogenic process is regulated by a balance between stimulatory and inhibitory factors, which may be released by the tumor itself or by the surrounding tissues. The urokinase-type plasminogen activator receptor (u-PAR) is considered a key element in EC proliferation and migration since the activation of plasminogen at the cell surface is tightly controlled by the internalization and degradation of activator/inhibitor complexes by the u-PAR/LRP system. The members of the low-density lipoprotein (LDL) receptor family are a group of cell surface receptors that transport a large number of macromolecules into cells. This receptor includes binding sites for numerous ligands, including complexes of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) with urokinase-(u-PA) or tissue-type plasminogen activator (t-PA) [18] and receptor-associated protein (RAP) [19]. Due to the broad spectrum of ligands for LRP, it has been suggested that this receptor functions in many processes including lipoprotein metabolism, hemostasis, cellular growth and tissue remodeling.

We previously reported that sMTf could inhibit migration of cancer and endothelial cells expressing MTf as well as differentiation of endothelial cells into capillary-like structures *in vitro* [2]. These results led us to further investigate the effects of sMTf on tumor growth and related angiogenesis *in vivo*. Results presented here clearly demonstrate that sMTf inhibits the growth of subcutaneous tumors derived from U-87 MG glioblastoma cells and NCI-H460 large lung carcinoma cells. In addition, sMTf treatment reduced the angiogenesis associated with the development of subcutaneous glioblastoma. Our data suggest that sMTf treatment might exert its anti-cancer and anti-angiogenic properties in MTf-expressing cells by affecting key players involved in plasmin activity such as u-PAR and LRP.

## MATERIALS AND METHODS

### *Materials*

Recombinant human melanotransferrin (sMTf) (produced by introducing a stop codon following the glycine residue at position 711) and L235 monoclonal antibody (mAb) were kindly provided by Biomarin Pharmaceutical (Novato, CA).

### *Cell culture*

Human multiform glioblastoma cells (U-87 MG) were grown in minimal essential medium (MEM) containing 1 mM sodium pyruvate and 10% fetal bovine serum (FBS). Human large lung carcinoma cells (NCI-H460) were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 2.5 g/L d-glucose, 1 mM pyruvate, 10 mM HEPES and 10% calf serum (CS). Human dermal microvascular endothelial cells (HMEC-1) (Center for Disease Control and Prevention; Atlanta, GA) were cultured as previously described [2]. Chinese hamster ovary (CHO) cells transfected with full-length human MTf cDNA (p97TRVb CHO cells; referred to as MTf-transfected cells in the text) or with control vector (TRVb CHO cells; referred to as Mock cells in the text) were from Dr. Malcom Kennard of the University of British Columbia (Vancouver, BC). CHO cells were maintained in F12 medium containing 1 mM HEPES and 10% CS. Cell lines were cultured at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub>/95% air atmosphere.

### **In vivo Matrigel™ plug angiogenesis assay**

The Matrigel™ implantation assay was based on the method of Passaniti et al. [20]. Angiogenesis is considered to be indicated by the growth of blood vessels from subcutaneous tissue into a solid piece of Matrigel™. Specific pathogen-free, female CrI:CD-1®-nuBR nude mice were obtained from Charles River Laboratories (Lasalle, QC). All of the mice used were 5–10 weeks of age. All animal studies were conducted in accordance with recommendations from the Canadian Council on Animal Care (CCAC) for care and use of experimental animals. Prior to injection, heparin was incubated with or without bFGF (250 ng/mL) or VEGF<sub>165</sub> (200 ng/mL) for 5 min then diluted into phenol red-free Matrigel™ on ice for a final concentration of 0.0025 units/mL heparin. Then, mice were subcutaneously injected under anesthesia in the ventral midline region of the right flank with 0.5 mL of Matrigel™ alone or with Matrigel™ containing bFGF or VEGF. After 7 days, mice were sacrificed and Matrigel™ implants were harvested, washed with PBS and photographed with

a Nikon Coolpix™ 5000 digital camera. The remaining implants were immediately frozen and lyophilized overnight in order to evaluate the hemoglobin (Hb) concentrations.

Testing of anti-angiogenic substances was initiated at the time of Matrigel™ implantation. Systemic treatment with repeated injection of sMTf (5.0 mg/kg) was performed by subcutaneous injection at days 0, 2, 4 and 6 post-implantation. A Ringer/HEPES solution was used for control treatment in all experiments.

#### ***Subcutaneous xenograft model***

For tumor cell inoculation in nude mice, U-87 MG or NCI-H460 cells were harvested by trypsinization using a trypsin/EDTA solution. Cells were washed three times with phosphate-buffered saline  $\text{Ca}^{2+}$ – $\text{Mg}^{2+}$  free (PBS-CMF) and centrifuged. The resulting pellet was resuspended in 1% methyl-cellulose in serum-free MEM at a concentration of  $2.5 \times 10^6$  cells per 100  $\mu\text{L}$ . Animals were anesthetized by  $\text{O}_2$ /isoflurane inhalation and tumors were established by subcutaneous injection of 100  $\mu\text{L}$  from cell suspension into the right flank of female Crl:CD-1®-nuBR nude mice. At 3 days after cell inoculation, animals were randomly separated in three groups. Alzet micro-osmotic pumps (model 1007D-1002; Durect Corporation) filled with Ringer/HEPES (R/H) or sMTf were implanted in the left flanks of  $\text{O}_2$ /isoflurane anesthetized mice. Prior to the surgery, pumps were incubated in a NaCl solution (0.9%) at 37 °C for 16 h and filled following the supplier's directions.

Tumors were measured in  $\text{O}_2$ /isoflurane anesthetized mice every 3 days using a digital caliper and tumor volume was calculated as:  $\pi/6 \times \text{length} \times \text{width}^2$ . Tumor volume measurements less than initial values define partial tumor regression in sMTf-treated mice. When the first mouse from control group held a tumor reaching 1000  $\text{mm}^3$ , tumors were photographed and mice from every group were sacrificed. Experiments were performed on 8 animals for each group. Tumors were then cut in equal parts for the quantification of hemoglobin and RT-PCR. Recombinant sMTf treatment toxicity was evaluated by monitoring the body weight of control and treated mice, considering that a weight loss > 20% results in a toxic effect. A brief necropsy was also performed to assess the toxicity to other organs.

#### ***Hemoglobin quantification***

Matrigel™ implants or tumor sections were washed twice with PBS–CMF and freeze-dried for 24 h. Samples were then crushed and resuspended in 0.1% Triton X-100.

Samples were mixed frequently for 1 h and centrifuged at 14,000×g for 15 min to remove particles. The concentration of hemoglobin (Hb) in the supernatant was then determined directly by measuring the absorbance at 405 nm using a Spectramax Plus spectrophotometer (Molecular Devices) and compared with a standard curve of purified Hb (Sigma-Aldrich, Oakville, ON). Hemoglobin content was expressed in µg Hb/mg of dried sample.

#### ***In vivo metastasis assay***

The metastasis assay was based on the method of Muto [21] with minor modifications. Briefly, CHO Mock and MTf-transfected cells were incubated with [<sup>3</sup>H]-thymidine for 48 h. After the metabolic labeling,  $5 \times 10^5$  cells were injected into the tail vein of 5- to 10-week-old male Crl:CD-1 mice. After 24 h, whole body perfusion was performed with PBS–CMF for 15 min. Then, organs were removed and solubilized with Solvable™ for 48 h at 37 °C. The amount of [<sup>3</sup>H]-thymidine labeled CHO cells was measured by liquid-scintillation spectrometry. Results are expressed as the amount of labeled cells by mg of tissue.

#### ***Cell migration assay***

Cell migration was performed using Transwell filters (Costar, 8-µm pore size) precoated (top and bottom) with 0.15% gelatin as previously described [1]. Briefly,  $1 \times 10^4$  cells were resuspended in 100 µL of fresh medium with or without sMTf (100 nM) and added to the upper chamber of each Transwell. Medium in the lower chamber contained 10% serum with or without sMTf. After 18 h of migration, cells were fixed, stained and visualized at a 100× magnification using a Nikon Coolpix™ 5000 digital camera (Nikon Canada, Mississauga, ON) fixed to a Nikon TMS-F microscope. Migrated cells were quantified by counting at least 5 random fields per filter using Northern Eclipse software (Empix Imaging, Mississauga, ON).

#### ***Cell invasion assay***

Tumor cell invasion was assessed using Transwell filters (Costar; 8-µm pore size) precoated with 50 µg air-dried Matrigel™ matrix (BD Bioscience, Mississauga, ON) as described in [4]. Cells were resuspended in serum-free medium with or without recombinant sMTf (100 nM) and added to the upper chambers of the Transwells. The lower chambers contained 10% serum as well as recombinant sMTf. After 48 h, invading cells were fixed, stained and quantified as described through the cell migration assay.

### ***Western blot analysis***

Cells (HMEC-1, NCI-H460 and U-87 MG) were incubated with sMTf (100 nM) during 18 h at 37 °C under a 5% CO<sub>2</sub>/95% air atmosphere. Treated cells were washed twice with PBS–CMF and solubilized on ice in lysis buffer [2]. Proteins were separated by SDS–PAGE and blotted onto a polyvinylidene difluoride membrane. Following transfer, the immunodetection of LRP- $\alpha$  (clone 8G1; Research Diagnostics Inc.), u-PAR (3937; American Diagnostica Inc.), MTf (mAb L235) and GAPDH (RGM2; Advanced Immunochemical Inc.) were performed using enhanced chemiluminescent reagents (Perkin Elmer).

### ***Reverse transcriptase–polymerase chain reaction***

HMEC-1 cells were exposed to fresh medium containing 100 nM sMTf for 18 h at 37 °C under a 5% CO<sub>2</sub>/95% air atmosphere. Total RNA was extracted using TRIzol™ reagent from Invitrogen (Burlington, ON). RT–PCR reactions were performed using SuperSript™ One-Step RT–PCR from Invitrogen. Specific primers used in this study were designed by MacVector™ software using human cDNA sequences deposited at the NCBI data bank. The upstream and downstream primers used are described in [2] and as follows: for MTf: 5'-CCTAAGTGGCGAGGACATTTACAC-3' and 5'-TAGTTCTTGGGGTTGTTCACGGGC-3', CD105: 5'-CCTTTGGTGCCTTCCTGATTG-3' and 5'-TGTTTGGTTCCTGGGACAAGTTC-3', for CD31: 5'-TATCCAAGGTCAGCAGCATCGTGG-3' and 5'-GGGTTGTCTTTGAATACCGCAG-3' and for  $\beta$ -tubulin: 5'-CTGGCACACACCTTCTACAATG-3' and 5'-AATGTCACGCACGATTTCCTCCGC-3'. RT–PCR conditions were optimized so that gene products were obtained during the exponential phase of amplification. Gene product amplifications were performed for 35 cycles of PCR [94 °C for 30 s, 60 °C for 30 s, 72 °C for 1 min]. RT–PCR was also performed using RNA extracted from subcutaneous U-87 MG-derived tumors previously excised from mice. In this case, gene product amplifications were performed for 35 cycles of PCR [94 °C for 30 s, 60 °C for 30 s (55 °C for CD31), 72 °C for 1 min]. Amplification products were electrophoresed on 2% (w/v) agarose gels and visualized under UV light following staining with ethidium bromide.

### ***Statistical analysis***

Experimental data were evaluated by Student's *t*-test using GraphPad Prism (San Diego, USA). The resulting *P*-values designate the level of significance. Tumor growth inhibition is determined from median tumor volumes in mm<sup>3</sup> from the treated and control



groups. Time points used to determine the median tumor volumes were designated as the first day of treatment and the day when the first mouse from the control group held a tumor of 1000 mm<sup>3</sup>.

## RESULTS

### *sMTf treatment inhibits bFGF- and VEGF-induced neovascularization*

The recombinant truncated and soluble form of mMTf (sMTf) was previously reported to reduce endothelial cell (EC) migration and differentiation into capillary-like structure without affecting EC proliferation [1], [2] and [11]. Hence, we first confirmed the effects of sMTf on EC migration. Fig. 1A shows that 100 nM sMTf decreased by half the migration of HMEC-1 cells on gelatin. We then evaluated the capacity of sMTf to interfere with angiogenesis stimulation by various growth factors. Malignant tumors develop their own vascular networks by secreting growth factors which stimulate endothelial migration and proliferation [22] and [23]. The Matrigel™ plug neovascularization assay allows evaluation of the angiogenesis levels by measuring the hemoglobin content in the implant. The factor-free Matrigel™ implants showed barely apparent pink hue coloration. However, the addition of bFGF and VEGF to Matrigel™ induced strong neovascularization (Fig. 1B) and an increase in hemoglobin content of about three- to four-fold higher than in the control Matrigel™ samples (Fig. 1C). In mice treated with sMTf, the stimulation of neovascularization by bFGF and VEGF was diminished by 50% as judged by the corresponding hemoglobin content (Fig. 1C). These data suggest that sMTf interferes with bFGF- and VEGF-induced angiogenesis.

### *sMTf reduces the growth of glioblastoma and lung carcinoma subcutaneous tumors*

Considering the results obtained in the neovascularization of Matrigel™ implants, the impact of sMTf administration on xenografts tumor growth was further investigated. U-87 MG and NCI-H460 cells were inoculated into the right flank of nude mice whereas Alzet osmotic micro-pumps containing sMTf or Ringer/HEPES control solution were implanted in their left flank. In the glioblastoma model, control mice showed a tumor growth upon the fifth day of treatment, while mice treated with sMTf (2.5 mg/kg/day) display a tumor growth at 18 days of treatment. Interestingly, tumors from mice treated with sMTf 10 mg/kg/day do not present significant growth toward the study (Fig. 2). Indeed, we observed a 41.3% regression in tumor volume for 3 out of 8 mice treated with sMTf 10 mg/kg/day. After 18 days of treatment, i.e. when the first tumor of control mice reached 1000 mm<sup>3</sup>, the difference in tumor size between control and sMTf-treated mice was significant. We were

able to determine a tumor growth inhibition of 73.8% and 91.8% in sMTf-treated mice at 2.5 and 10 mg/kg/day, respectively (Table 1). In the lung carcinoma model, sMTf treatment (2.5 mg/kg/day) inhibits tumor growth for a 15-day period. After 18 days of treatment, mice treated with sMTf at 2.5 and 10 mg/kg/day have tumors with average volumes reaching 140 and 65 mm<sup>3</sup> respectively, compared to 642 mm<sup>3</sup> for tumors in the control group (Table 1). Furthermore, tumor growth inhibition was sustained for 18 days in mice treated with 10 mg/kg/day of sMTf (Fig. 2) and complete remission was observed in one case. Seven out of 9 mice treated with sMTf 10 mg/kg/day showed a regression in tumor size of about 50% when compared to the initial tumor volume. The corresponding tumor growth inhibition values reached 87.6% and 97.2% in mice treated with sMTf at 2.5 and 10 mg/kg/day, respectively (Table 1). Additionally, tumor growth inhibition by sMTf at 10 mg/kg/day is significantly different from that obtained at 2.5 mg/kg/day in both subcutaneous xenograft models. sMTf can thus be considered as an active anti-tumor protein. In both cases, sMTf treatment had no significant effect on mouse body weight and a gross necropsy revealed no physiological modifications. Results from molecular stability demonstrated that sMTf is stable at 37 °C for 28 days without the identification of any low molecular weight fragments by SDS–PAGE analysis (data not shown).

#### ***sMTf inhibits angiogenesis in subcutaneous glioblastoma development***

In order to demonstrate that sMTf induced a reduction in tumor growth by interfering throughout the angiogenic process, Hb content was quantified in subcutaneous tumors derived from U-87 MG and NCI-H460 cells. The results demonstrated that Hb content was 2-fold higher in U-87 MG than in NCI-H460 tumors (Fig. 3A), indicating that angiogenesis in subcutaneous NCI-H460-derived tumor is much lower than in U-87 MG-derived ones. This led us to evaluate angiogenic development in U-87 MG-derived tumors, rather than in the lung carcinoma model. As soon as the first tumor from the control group reached 1000 mm<sup>3</sup>, tumors were excised and the Hb content was measured. Fig. 3B demonstrates that sMTf treatment resulted in a reduction of Hb levels at both doses by approximately 50%. Additionally, mRNA expression of CD105, an endothelial cell marker from newly formed vessels, was greatly down regulated in sMTf-treated U-87 MG-derived tumors (Fig. 3C). However, the mRNA expression of another endothelial cell marker, CD31 or PECAM, was

unaffected by sMTf treatments when compared to the loading control  $\beta$ -tubulin (Fig. 3C). Western blot analysis also revealed that CD31 protein expression in U-87 MG-derived tumors was unchanged after sMTf treatments (data not shown). These results are in agreement with recent studies reporting that CD105 is a better marker than CD31 for newly formed vessels in glioblastoma [24]. In conclusion, the hemoglobin content and CD105 mRNA levels (even though semi-quantitative) in U-87 MG-derived tumors suggest that sMTf exerts an anti-angiogenic activity during the development of subcutaneous glioblastoma.

Since angiogenesis is strongly induced by cytokines from tumor cells, levels of bFGF and VEGF mRNA were studied in tumor tissue derived from U-87 MG cells. The mRNA expression of these growth factors was unchanged in subcutaneous glioblastoma tumors treated with sMTf when compared to tumor tissue from the control group (data not shown). These results indicate that although sMTf inhibits bFGF- and VEGF-induced angiogenesis, the inhibition of angiogenesis by sMTf is not the result of a negative regulation in the expression of these growth factors in U-87 MG-derived tumors.

#### ***MTf expression is associated with cell invasion in vivo***

MTf was previously demonstrated to be involved in cell migration and invasion *in vitro* [2]. More recently, it was reported that MTf overexpression in melanoma cells contributes to tumor progression as well as cell invasion [9,10]. In order to determine the impact of MTf expression in tissue invasion, an *in vivo* metastasis assay was performed. The transfection of CHO cells with full-length human MTf cDNA led to the detection of a band around 97 kDa by Western blot analysis corresponding to MTf (Fig. 4A). This band is effectively lacking in CHO cells transfected with the control vector, referred as Mock control cells. CHO cells (Mock control and MTf-transfected) were then metabolically stained with [ $^3$ H]-thymidine and injected into the tail vein of CD-1 mice. After 24 h, the accumulation of labelled cells in several organs was quantified by liquid-scintillation spectrometry (Fig. 4B). It appears that the presence of [ $^3$ H]-thymidine-labelled CHO MTf-transfected cells is increased by 8-, 10- and 6-fold in the brain, lung and kidney, respectively. The accumulation of CHO cells in the heart was not modulated by the expression of MTf. Meanwhile, the accumulation of CHO cells (Mock control and MTf-transfected) was barely detectable in the

liver (Fig. 4B). Results show that MTf overexpression in CHO cells is associated to brain, lung and kidney invasion. These results also indicate that MTf is a key player during cell invasion *in vivo* and that its expression might contribute to metastasis formation.

### ***Effects of sMTf on tumor cell invasive capabilities***

We already established that sMTf could modulate the generation of plasmin through the reduction of the LRP-mediated u-PAR endocytosis at the surface of ECs [2]. Considering that plasmin is involved in cell migration and invasion, we then investigated the effects of sMTf on tumor cells' migratory abilities. Figs. 5A–B indicates that the presence of sMTf reduced by 30% and 70% the migration and the invasion of NCI-H460 large cell lung carcinoma cells. Nevertheless, the invasive capabilities of U-87 MG glioblastoma cells were unaffected by sMTf (Figs. 5C–D). The proliferation of NCI-H460 and U-87 MG cells measured by [ $^3$ H]-thymidine incorporation were unaffected by sMTf treatment (data not shown).

sMTf was reported to reduce the protein expression of LRP and u-PAR in endothelial cells [2]. We decided to extend this analysis to U-87 MG and NCI-H460 cells. While LRP and u-PAR protein expression were unchanged in sMTf-treated U-87 MG glioma cells, the same treatment induced a significant reduction in the expression of both receptors in NCI-H460 large lung carcinoma cells. In fact, LRP and u-PAR could not be detected in these cells after sMTf treatment, as shown in Fig. 6A. In agreement with prior results, the treatment of HMEC-1 endothelial cells with sMTf also resulted in a great reduction of both LRP and u-PAR protein expression when compared to the loading control GAPDH (Fig. 6A). It is to note that mMTf expression was unaffected by sMTf in NCI-H460 and HMEC-1 cells (Fig. 6A–B). In addition, endogenous mMTf levels were under the detectable limit in U-87 MG cells.

Several members of the LDLR family, including LRP, are involved in the regulation of u-PA/u-PAR activity. Even though previous studies report modulation of these receptors during the regulation of the u-PA/u-PAR system [25–27], LRP mRNA levels were unaffected in NCI-H460 and HMEC-1 cells treated with sMTf under our experimental conditions (Fig. 6B). The mRNA expression of other LDLR family members such as LRP1b, LRP8, LRP11, LRP2, LDL-R and VLDL-R were not modulated by sMTf (data not shown). u-PAR mRNA

levels were also similar in HMEC-1 and NCI-H460 cells in presence and in absence of exogenous sMTf, suggesting that sMTf treatment seems to act downstream of u-PAR and LRP gene regulation (Fig. 5B). Results presented here further propose an association between endogenous MTf expression and the *in vitro* u-PAR/LRP system targeting by sMTf treatment.

## DISCUSSION

Our previous results demonstrate that sMTf inhibits ECs movement as well as tubulogenesis [2]. The purpose of the current study is to evaluate the anti-cancer and anti-angiogenic properties of sMTf during tumor development. We show here that sMTf treatment clearly decreases the angiogenesis stimulated by growth factors and leads to efficient growth inhibition of subcutaneous U-87 MG and NCI-H460 cells.

Tumor growth and metastasis require persistent angiogenesis and in the absence of new vasculature, tumor cells become necrotic or apoptotic [28]. New blood vessel growth occurs in multiple stages and is under complex controls by angiogenic inducers such as bFGF and VEGF. ECs entering tumor tissue in response to chemo-attractants and growth factors, such as VEGF, proliferate to initiate neovascularization. In this study we demonstrate that sMTf interferes with angiogenesis induced by growth factors. Tumor cells in very aggressive glioblastomas, especially those surrounding micro vessels, express high levels of VEGF, suggesting that tumor and ECs vigorously interact [29]. Thus, while cancer cells may actively recruit ECs to support their proliferation and promote the formation of new vasculature, sMTf strongly interferes with these processes. Hence, further studies are required to determine whether sMTf affects the expression of the receptors involved in VEGF signaling pathway, such as VEGFR-1 and VEGFR-2.

We recently reported that mMTf-induced angiogenesis was inhibited by systemic treatment with sMTf [11]. Here, we show that constant delivery of sMTf into nude mice with Alzet micro-osmotic pumps contributed to a significant reduction in the growth of subcutaneous U-87 MG-derived tumor. This potent inhibition of tumor growth was also associated with a decrease of the hemoglobin content in the glioma tumors. In fact, the evaluation of angiogenesis in tumors, as determined by the hemoglobin content, revealed that U-87 MG-derived tumor development appears to be strongly dependent on angiogenesis. Analysis of microvessel density in astrocytic tumors in association with prognosis has therefore produced conflicting results [30,31]. Although pan-endothelial markers, such as anti-CD31, -CD34 and -factor-VIII antibodies, are generally used in the evaluation of angiogenesis, they not only react with newly formed vessels but also with normal vessels,

which are entrapped within tumor tissues. Endoglin, or CD105, is a transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) binding protein expressed on the surface of endothelial cells which is essential for angiogenesis [32]. It was reported that anti-CD105 antibodies preferentially react with activated endothelial cells in angiogenic tissues, but only weakly or not at all with those of most normal tissues [33,34]. Although Gomez-Esquer et al. showed that endoglin mRNA did not correlate with breast tumor aggressiveness [35], several reports have identified CD105 as a superior marker for the evaluation of angiogenesis in various types of cancer [24], notably in glioblastomas [36]. Overall, our results strengthen the fact that sMTf interferes with pathological angiogenesis by inhibiting endothelial cell migration *in vitro*, reducing the hemoglobin content and the CD105 mRNA expression in the U-87 MG-derived tumors, and by leading to the inhibition of VEGF- and bFGF-induced neovascularization of Matrigel™ plug. Therefore, sMTf appears to be an effective anti-angiogenic agent in subcutaneous glioblastoma tumors by targeting the endothelial environment.

In this study, we show that sMTf treatment inhibits the growth of subcutaneous NCI-H460-derived tumors. These results are consistent with the inhibition of NCI-H460 cell migration and invasion *in vitro* by sMTf. Considering that mMTf binds to plasminogen and facilitates its activation [4], the truncated form sMTf may interfere with cell motility via the modulation of plasmin formation. Hence, our results demonstrate that the addition of sMTf to endothelial and lung carcinoma cells reduced their invasive capacities *in vitro* in association with a decrease in their u-PAR and LRP protein expression. A disruption in the equilibrium of plasminogen activation system, as it occurs in the pathogenesis of cancer, may drive malignant cells to invade surrounding tissue and eventually to metastasize to distant body regions [37]. In addition to the binding of plasminogen to sMTf, down-regulation of u-PAR expression in ECs may act as a strong modulator of plasmin formation. Considering that sMTf reduces the free and active u-PAR regeneration at the HMEC-1 cell surface by both increasing the internalization of his scavenger receptor LRP and reducing its protein expression [2], we believe that sMTf acts similarly in NCI-H460 cells. Thus, modulation of these receptors – such as decrease in their synthesis or/and increase in their turnover – by sMTf could greatly participate to the inhibition of cell migration in these cells. Indeed, modulation of u-PAR/LRP expression by sMTf appears to be an important feature in cellular



invasion and migration *in vitro*. Nevertheless, LRP has a protective role in maintaining the vascular wall structure and its deficiency or overexpression can cause vascular disorders (reviewed in Llorente-Cortes and Badimon [38]). Therefore, further studies are needed to determine the effects of sMTf on healthy tissue. Our results suggest that sMTf treatment may affect the growth of tumor cells such as NCI-H460 by targeting the u-PAR/LRP system.

Inhibition of tumor growth by sMTf may result from different molecular events. Here we suggest that sMTf treatment modulate the equilibrium between mMTf and its soluble secreted form. Considering that the average concentration of circulating MTf in human plasma reaches 33 pM [5], the addition of exogenous sMTf can disturb the MTf equilibrium. Disruption in this balance could greatly modulate plasmin formation at the cell surface in response to the binding of plasminogen to sMTf rather than endogenous mMTf. We already reported that the binding of plasminogen to mMTf could favour its conversion into plasmin, thereby promoting cell migration and invasion [4,9]. The accumulation of MTf transfected cells in mice brain, lung and liver reported in this study confirm that mMTf expression triggers cell invasion *in vivo*. Downregulation of MTf expression also provides further evidence that endogenous mMTf plays a key role during SK-Mel-28 melanoma cell proliferation, migration, tumor growth and metastasis [9,10]. Altogether, our findings and that from others indicate that mMTf is a key player in tumor growth and invasiveness. In this regard, sMTf treatment seems to exert anti-angiogenic and anti-tumor activities in a MTf-expressing environment, while the equivalent treatment performed in a situation lacking MTf expression triggers no specific response. Although additional analyses are required to support this hypothesis, the association between endogenous MTf expression and sMTf treatment efficacy could partly explain the results obtained in both subcutaneous models. This study has produced further evidence that the anti-angiogenic activity of sMTf may be considered as a significant potential clinical treatment. In addition, the duality in sMTf treatment distinguishes it from single-target, conventional anti-angiogenic and anti-cancer therapies. Likewise, mMTf would be an interesting therapeutic target since its expression in tumors could increase their invasion to adjacent tissues. We could also consider mMTf as a potential biomarker for the selection of cancer patients in the use of sMTf treatment.

These are the first *in vivo* results showing that sMTf could reduce the growth of U-87 MG- and NCI-H460-derived tumors. This present study demonstrates that sMTf contributes to the reduction of angiogenesis and tumor growth. Consequently, sMTf would provide a novel approach to tumor treatment by targeting both tumoral endothelial and cancer cells.

### **Acknowledgments**

This study was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and by research funding from Valorisation Recherche Québec and Gestion Valeo s.e.c. to R. Béliveau. Dr. Béliveau holds of a Research Chair in Cancer Prevention from Université du Québec à Montréal (UQÀM). Y. Rolland is a recipient of a Ph.D scholarship from NSERC, J. Michaud-Levesque is a recipient of a Ph.D scholarship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). We thank Dr. Anthony Regina, Normand Lapierre and Constance Gagnon for their technical support.

## REFERENCES

- [1] M. Demeule, Y. Bertrand, J. Michaud-Levesque, J. Jodoin, Y. Rolland, R. Gabathuler and R. Beliveau, Regulation of plasminogen activation: a role for melanotransferrin (p97) in cell migration, *Blood* **102** (2003), pp. 1723–1731.
- [2] J. Michaud-Levesque, Y. Rolland, M. Demeule, Y. Bertrand and R. Beliveau, Inhibition of endothelial cell movement and tubulogenesis by human recombinant soluble melanotransferrin: involvement of the u-PAR/LRP plasminolytic system, *Biochim. Biophys. Acta* **1743** (2005), pp. 243–253.
- [3] R. Sala, W.A. Jefferies, B. Walker, J. Yang, J. Tiong, S.K. Law, M.F. Carlevaro, E. Di Marco, A. Vacca, R. Cancedda, F.D. Cancedda and D. Ribatti, The human melanoma associated protein melanotransferrin promotes endothelial cell migration and angiogenesis in vivo, *Eur. J. Cell Biol.* **81** (2002), pp. 599–607.
- [4] J. Michaud-Levesque, M. Demeule and R. Beliveau, Stimulation of cell surface plasminogen activation by membrane-bound melanotransferrin: a key phenomenon for cell invasion, *Exp. Cell Res.* **308** (2005), pp. 479–490.
- [5] D.K. Kim, M.Y. Seo, S.W. Lim, S. Kim, J.W. Kim, B.J. Carroll, D.Y. Kwon, T. Kwon and S.S. Kang, Serum melanotransferrin, p97 as a biochemical marker of Alzheimer's disease, *Neuropsychopharmacology* **25** (2001), pp. 84–90.
- [6] J.P. Brown, R.M. Hewick, I. Hellstrom, K.E. Hellstrom, R.F. Doolittle and W.J. Dreyer, Human melanoma-associated antigen p97 is structurally and functionally related to transferrin, *Nature* **296** (1982), pp. 171–173.
- [7] J.P. Brown, K. Nishiyama, I. Hellstrom and K.E. Hellstrom, Structural characterization of human melanoma-associated antigen p97 with monoclonal antibodies, *J. Immunol.* **127** (1981), pp. 539–546.
- [8] R. Alemany, M.R. Vila, C. Franci, G. Egea, F.X. Real and T.M. Thomson, Glycosyl phosphatidylinositol membrane anchoring of melanotransferrin (p97): apical compartmentalization in intestinal epithelial cells, *J. Cell Sci.* **104** (Pt 4) (1993), pp. 1155–1162.
- [9] Y. Bertrand, M. Demeule, J. Michaud-Levesque and R. Beliveau, Melanotransferrin induces human melanoma SK-Mel-28 cell invasion in vivo, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **353** (2007), pp. 418–423.

- [10] L.L. Dunn, E.O. Sekyere, Y.S. Rahmanto and D.R. Richardson, The function of melanotransferrin: a role in melanoma cell proliferation and tumorigenesis, *Carcinogenesis* **27** (2006), pp. 2157–2169.
- [11] J. Michaud-Levesque, M. Demeule and R. Beliveau, In vivo inhibition of angiogenesis by a soluble form of melanotransferrin, *Carcinogenesis* **28** (2007), pp. 280–288.
- [12] Canada, S.C.d.c.I.n.d.c.d. Statistiques canadiennes sur le cancer 2006. (2006).
- [13] B.J. Flehinger, M. Kimmel and M.R. Melamed, The effect of surgical treatment on survival from early lung cancer. Implications for screening, *Chest* **101** (1992), pp. 1013–1018.
- [14] Society, A.c. Cancer Stat fact sheets. Cancer of the Brain and Other Nervous System. (2006).
- [15] P. Krauseneck and B. Muller, Chemotherapy of malignant gliomas, *Recent Results Cancer Res.* **135** (1994), pp. 135–147.
- [16] J. Folkman and M. Klagsbrun, Angiogenic factors, *Science* **235** (1987), pp. 442–447.
- [17] D. Hanahan and J. Folkman, Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis, *Cell* **86** (1996), pp. 353–364.
- [18] A. Nykjaer, C.M. Petersen, B. Moller, P.H. Jensen, S.K. Moestrup, T.L. Holtet, M. Etzerodt, H.C. Thogersen, M. Munch and P.A. Andreasen *et al.*, Purified alpha 2-macroglobulin receptor/LDL receptor-related protein binds urokinase-plasminogen activator inhibitor type-1 complex. Evidence that the alpha 2-macroglobulin receptor mediates cellular degradation of urokinase receptor-bound complexes, *J. Biol. Chem.* **267** (1992), pp. 14543–14546.
- [19] J. Herz, J.L. Goldstein, D.K. Strickland, Y.K. Ho and M.S. Brown, 39-kDa protein modulates binding of ligands to low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor, *J. Biol. Chem.* **266** (1991), pp. 21232–21238.
- [20] A. Passaniti, R.M. Taylor, R. Pili, Y. Guo, P.V. Long, J.A. Haney, R.R. Pauly, D.S. Grant and G.R. Martin, A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and antiangiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor, *Lab. Invest.* **67** (1992), pp. 519–528.
- [21] Y. Muto, K. Suzuki, E. Sato and H. Ishii, Carboxypeptidase B inhibitors reduce tissue factor-induced renal microthrombi in rats, *Eur. J. Pharmacol.* **461** (2003), pp. 181–189.

- [22] J. Grunstein, W.G. Roberts, O. Mathieu-Costello, D. Hanahan and R.S. Johnson, Tumor-derived expression of vascular endothelial growth factor is a critical factor in tumor expansion and vascular function, *Cancer Res.* **59** (1999), pp. 1592–1598.
- [23] M.R. Machein, W. Risau and K.H. Plate, Antiangiogenic gene therapy in a rat glioma model using a dominant-negative vascular endothelial growth factor receptor 2, *Hum. Gene Ther.* **10** (1999), pp. 1117–1128.
- [24] Y. Yao, T. Kubota, H. Takeuchi and K. Sato, Prognostic significance of microvessel density determined by an anti-CD105/endothelial monoclinal antibody in astrocytic tumors: comparison with an anti-CD31 monoclinal antibody, *Neuropathology* **25** (2005), pp. 201–206.
- [25] Y. Li, J.M. Knisely, W. Lu, L.M. McCormick, J. Wang, J. Henkin, A.L. Schwartz and G. Bu, Low density lipoprotein (LDL) receptor-related protein 1B impairs urokinase receptor regeneration on the cell surface and inhibits cell migration, *J. Biol. Chem.* **277** (2002), pp. 42366–42371.
- [26] D.J. Webb, D.H. Nguyen, M. Sankovic and S.L. Gonias, The very low density lipoprotein receptor regulates urokinase receptor catabolism and breast cancer cell motility in vitro, *J. Biol. Chem.* **274** (1999), pp. 7412–7420.
- [27] Y. Zhu, H. Bujo, H. Yamazaki, S. Hirayama, T. Kanaki, K. Takahashi, M. Shibasaki, W.J. Schneider and Y. Saito, Enhanced expression of the LDL receptor family member LR11 increases migration of smooth muscle cells *in vitro*, *Circulation* **105** (2002), pp. 1830–1836.
- [28] S. Parangi, M. O'Reilly, G. Christofori, L. Holmgren, J. Grosfeld, J. Folkman and D. Hanahan, Antiangiogenic therapy of transgenic mice impairs de novo tumor growth, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93** (1996), pp. 2002–2007.
- [29] X.W. Bian, X.F. Jiang, J.H. Chen, J.S. Bai, C. Dai, Q.L. Wang, J.Y. Lu, W. Zhao, R. Xin, M.Y. Liu, J.Q. Shi and J.M. Wang, Increased angiogenic capabilities of endothelial cells from microvessels of malignant human gliomas, *Int. Immunopharmacol.* **6** (2006), pp. 90–99.
- [30] S.P. Leon, R.D. Folkerth and P.M. Black, Microvessel density is a prognostic indicator for patients with astroglial brain tumors, *Cancer* **77** (1996), pp. 362–372.
- [31] Y. Yao, T. Kubota, K. Sato, R. Kitai, H. Takeuchi and H. Arishima, Prognostic value of vascular endothelial growth factor and its receptors Flt-1 and Flk-1 in astrocytic tumours, *Acta Neurochir. (Wien)* **143** (2001), pp. 159–166.

- [32] C. Li, I.N. Hampson, L. Hampson, P. Kumar, C. Bernabeu and S. Kumar, CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor beta1 on human vascular endothelial cells, *FASEB J.* **14** (2000), pp. 55–64.
- [33] P. Kumar, J.M. Wang and C. Bernabeu, CD 105 and angiogenesis, *J. Pathol.* **178** (1996), pp. 363–366.
- [34] J.M. Wang, S. Kumar, D. Pye, N. Haboubi and L. al-Nakib, Breast carcinoma: comparative study of tumor vasculature using two endothelial cell markers, *J. Natl. Cancer Inst.* **86** (1994), pp. 386–388.
- [35] F. Gomez-Esquer, D. Agudo, F. Martinez-Arribas, M.J. Nunez-Villar and J. Schneider, mRNA expression of the angiogenesis markers VEGF and CD105 (endoglin) in human breast cancer, *Anticancer Res.* **24** (2004), pp. 1581–1585.
- [36] S. Behrem, K. Zarkovic, N. Eskinja and N. Jonjic, Endoglin is a better marker than CD31 in evaluation of angiogenesis in glioblastoma, *Croat. Med. J.* **46** (2005), pp. 417–422.
- [37] P.A. Andreasen, L. Kjoller, L. Christensen and M.J. Duffy, The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review, *Int. J. Cancer* **72** (1997), pp. 1–22.
- [38] V. Llorente-Cortes and L. Badimon, LDL receptor-related protein and the vascular wall: implications for atherothrombosis, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25** (2005), pp. 497–504.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1. Inhibition of bFGF- and VEGF-induced neovascularization by sMTf treatment.** (A) The migration of HMEC-1 endothelial cell was performed in presence and in absence of sMTf (100 nM) during 18 hours as described in the Methods section. (B) bFGF- and VEGF-induced Matrigel™ plug *in vivo* angiogenesis assay in nude mice treated for 7 days with repeated subcutaneous injection of either Ringer/HEPES (R/H) control solution or sMTf (20 mg/kg/week) as described in the Materials and Methods section. Photographs obtained from representative samples are shown. (C) Relative Hb content from Matrigel™ implants containing or lacking bFGF and VEGF in nude mice treated for 7 days with subcutaneous administration of recombinant sMTf. Results are expressed as x-fold induction of angiogenesis as compared to Matrigel™ control conditions.  $n = 7$  for all conditions and the means  $\pm$  S.E. are shown. Statistically significant differences compared to R/H control conditions are indicated by \*\*\* for  $p < 0.001$  (Student's t-test).

**Figure 2. Inhibition of tumor growth by sMTf.** Nude mice were subcutaneously inoculated with U-87 MG glioblastoma cells and NCI-H460 large lung carcinoma cells. Three days after cell inoculation, animals were randomly separated in three groups and Alzet micro-osmotic pumps filled with Ringer/HEPES control solution (●) or sMTf at 2.5 (▲) and 10 mg/kg/day (■) were implanted as described in the Materials and Methods section. Experiments were performed on eight different animals for all conditions and the means  $\pm$  S.E. are shown. Statistically significant differences in tumor volumes are indicated by \*\* for  $p < 0.005$  and \*\*\* for  $p < 0.001$  (Student's t-test) when compared to tumors from the control group.

**Figure 3. sMTf treatment reduces angiogenesis *in vivo*.** Nude mice bearing tumors derived from U-87 MG and NCI-H460 cells were treated using Alzet micro-osmotic pumps containing with Ringer/HEPES control solution or sMTf (2.5 and 10 mg/kg). (A) Control tumors derived from U-87 MG and NCI-H460 cells with a volume of around 1000 mm<sup>3</sup> were excised and the hemoglobin contents were determined as described in the Material and Methods section. (B) When the first U-87 derived tumor from the control group reached 1000 mm<sup>3</sup>, control and sMTf treated tumors were excised and lyophilized to evaluate their hemoglobin content. (C) mRNA expression of CD105 (endoglin) and CD31 (PECAM) were also assessed on U-87 MG derived tumors treated or not with sMTf (2.5 and 10 mg/kg). RT-PCR analysis of  $\beta$ -tubulin was used as a loading control. Experiments were performed on

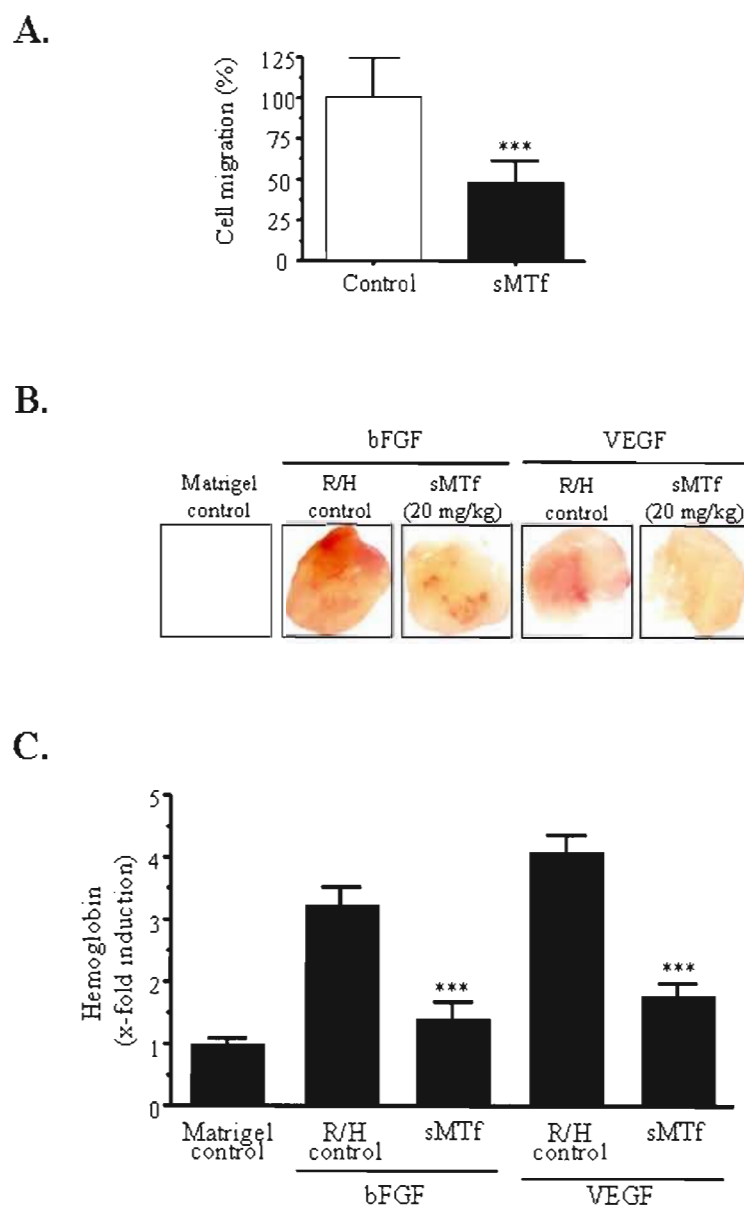
eight different animals for all conditions and the means  $\pm$  S.E. are shown. Statistically significant differences between hemoglobin contents are indicated by \*\* for  $p < 0.005$  (Student's t-test) when compared to the hemoglobin content in tumors from the control group.

**Figure 4. MTf expression correlates with cell invasion *in vivo*.** Chinese hamster ovary (CHO) cells were transfected with full-length human MTf cDNA (MTf-transfected) or with control vector (Mock control). (A) The protein expression of MTf was studied by Western blot in CHO Mock control and MTf-transfected cells as detailed in the Materials and Methods section. (B) CHO Mock control and MTf-transfected cells were metabolically labeled with [ $^3$ H]-thymidine and injected in the tail vein of Crl:CD-1 mice as described in the *in vivo* metastasis assay. After 24 hours, cell accumulation was quantified by liquid scintillation-spectrometry. Statistically significant differences compared to the control condition are indicated by \*\*\* for  $p < 0.001$  (Student's t-test).

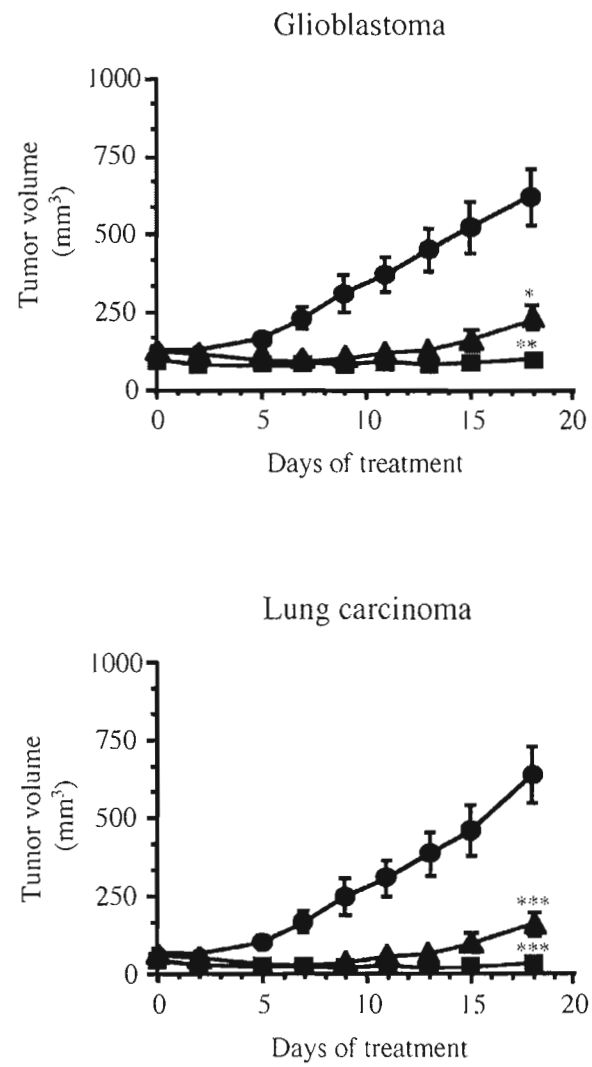
**Figure 5. Effects of sMTf on tumor cell migratory properties.** The migration of NCI-H460 lung carcinoma cells (A) and U-87 MG glioblastoma cells (C) was performed on gelatin coated Transwell filters in presence and in absence of sMTf (100nM). The invasion of NCI-H460 (B) and U-87 MG (D) cells was also studied with or without sMTf (100 nM) on dried-Matrigel<sup>TM</sup> coated filters as described in the Methods section. After 18 hours, cells were fixed, stained and the filter tops were cleaned. Cellular migration and invasion were quantified from 5 random fields using Northern Eclipse software. Statistically significant differences compared to the control condition are indicated by \*\* for  $p < 0.005$  and \*\*\* for  $p < 0.001$  (Student's t-test).

**Figure 6. sMTf treatment affects the u-PAR/LRP system in endothelial and large lung carcinoma cells.** (A) Protein expression of u-PAR and LRP were studied by Western blot in cells from human glioblastoma (U-87 MG), large lung carcinoma (NCI-H460) and in microvascular endothelial cells (HMEC-1) treated or not with 100 nM sMTf for 18 hours. (B) mRNA expression of u-PAR and LRP was also studied by semi-quantitative PCR in U-87 MG, NCI-H460 and HMEC-1 cells treated or not with sMTf. GAPDH expression was used as a loading control. Results are representative of three independent experiments.





**Figure 1.** Inhibition of bFGF- and VEGF-induced neovascularization by sMTf treatment.



**Figure 2.** Inhibition of tumor growth by sMTf.

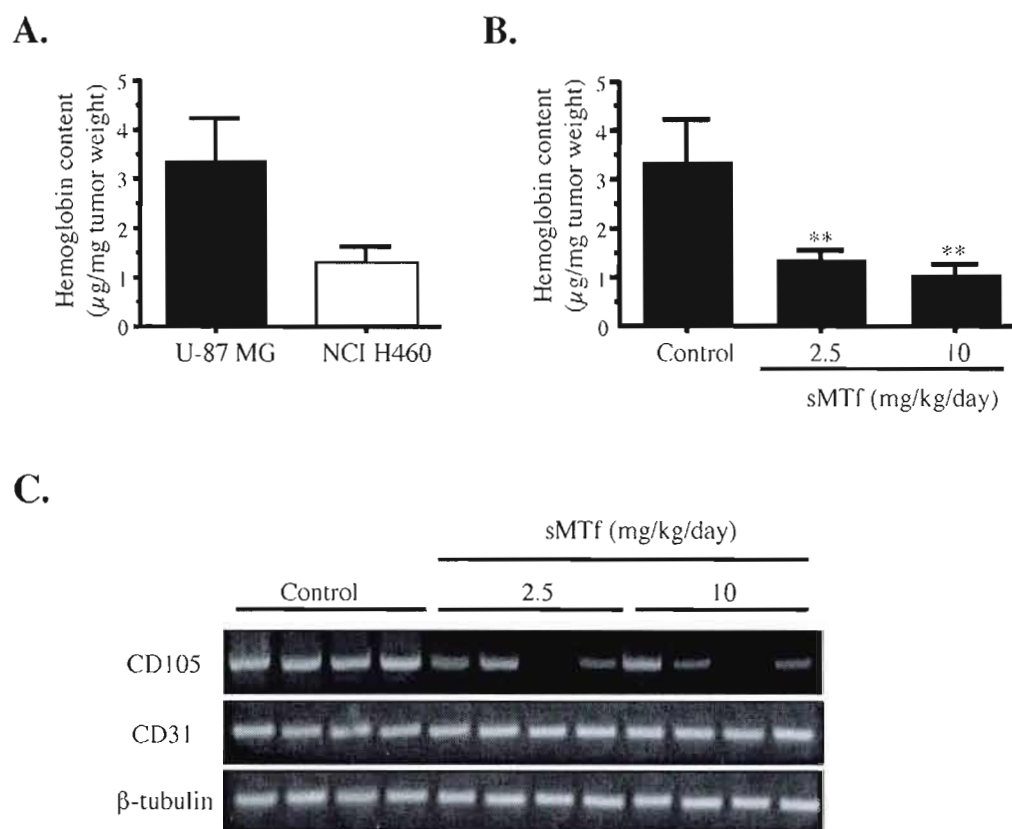
**Tableau 1.** Inhibition of tumor growth by sMTf.

**Table 1. Inhibition of tumor growth by sMTf.** Tumor cells from human glioblastoma (U-87 MG) and lung carcinoma (NCI H460) were inoculated subcutaneously in CrI:CD-1<sup>®</sup>-nuBR nude mice.

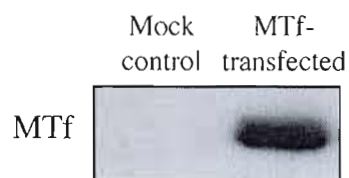
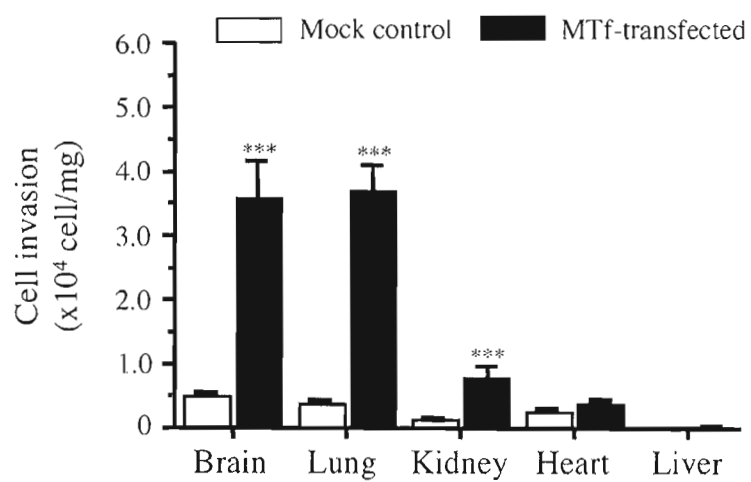
Three days after, micro-osmotic pumps containing Ringer/HEPES control solution or sMTf were implanted as described in the Materials and Methods section. The activity end points used to determine tumor inhibition is the median tumor volumes in mm<sup>3</sup> of the treated and control groups. Median tumor volumes were determined on the first day of treatment and at the end of the study- i.e. when the first mouse of the control group held a tumor of 1000 mm<sup>3</sup>. Tumor growth inhibition by sMTf is expressed as percent of control. Animals bearing tumor with a final volume below its initial one are defined here as partial tumor regression.

Tumor origin	sMTf Dosage (mg/Kg/day)	Volumes (mm <sup>3</sup> )		Tumor growth inhibition (%)	Partial tumor regression (9-11 days)
		Initial	Final		
Glioblastoma	0	88±32	591±229	0	0/8
	2.5	92±33	229±120	73.8	1/8
	10	63±7	104±25	91.8 <sup>a</sup>	3/8
Lung carcinoma	0	71±29	642±240	0	0/9
	2.5	69±26	140±69	87.6	5/9
	10	49±15	65±32	97.2 <sup>a</sup>	7/9

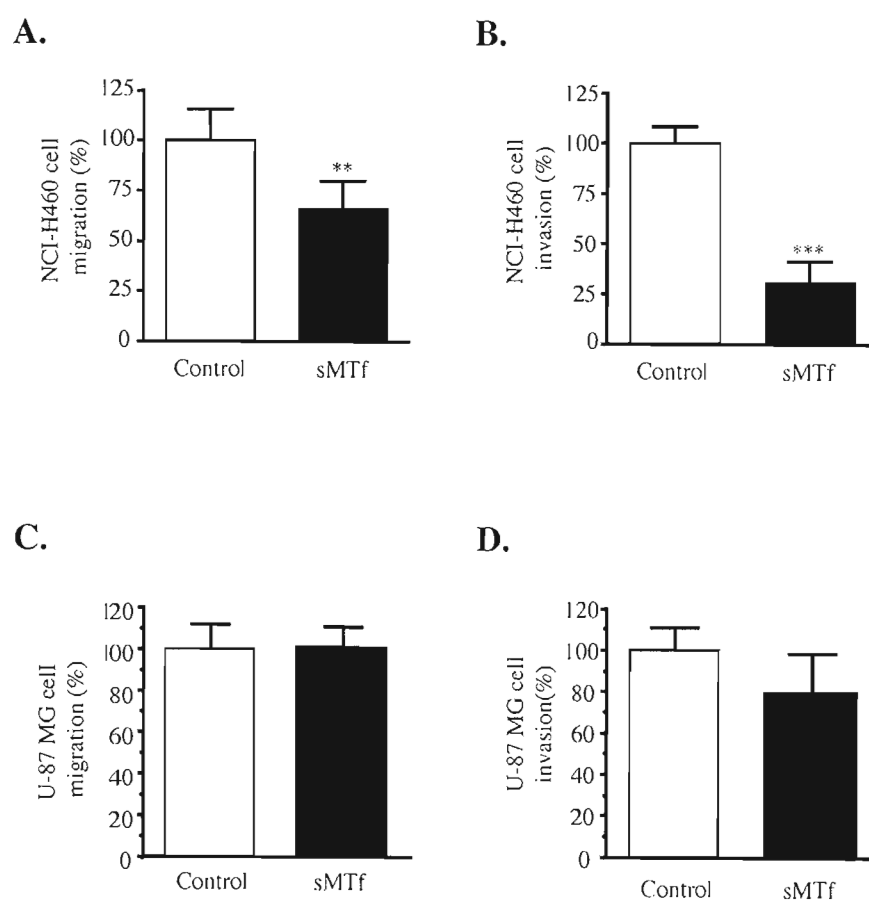
<sup>a</sup> Results are significantly different when compared to sMTf 2.5 mg/kg dose,  $p < 0.01$



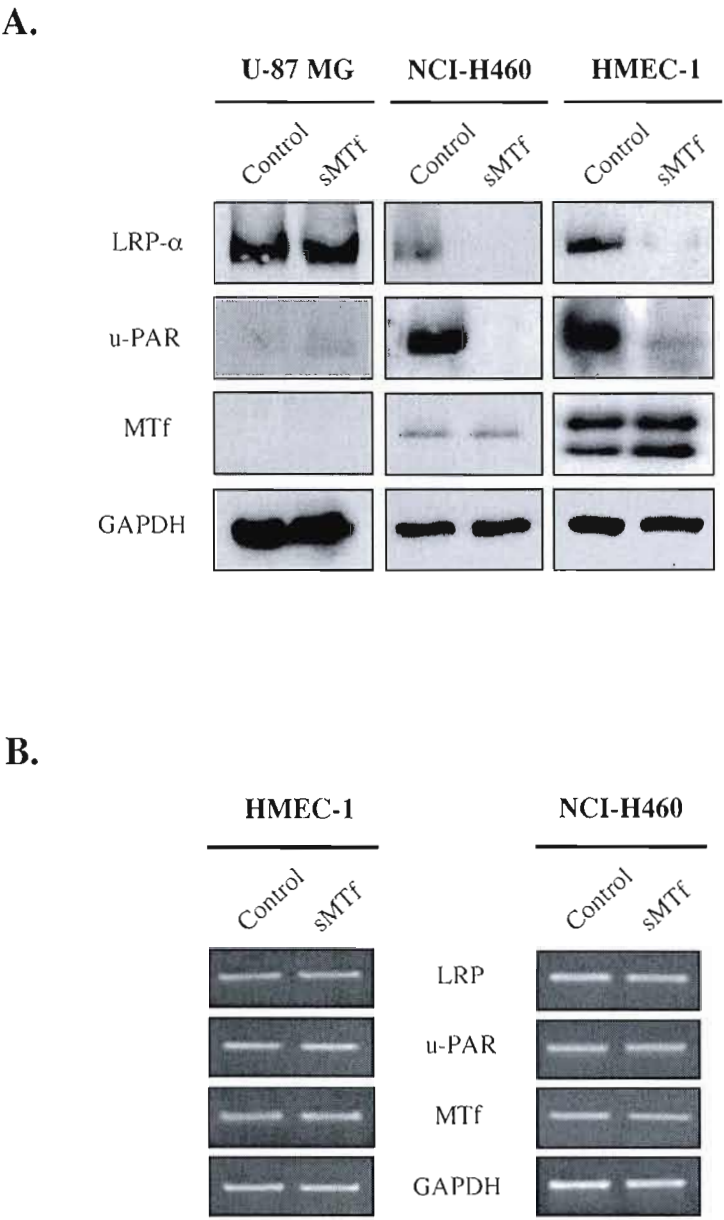
**Figure 3.** sMTf treatment reduces angiogenesis in vivo.

**A.****B.**

**Figure 4.** MTf expression correlates with cell invasion in vivo.



**Figure 5.** Effects of sMTf on tumor cell migratory properties.



**Figure 6.** sMTf treatment affects the u-PAR/LRP system in endothelial and large lung carcinoma cells.

## CONTRIBUTION DE L'AUTEUR PRINCIPAL ET DES CO-AUTEURS

**Note : Seul l'auteur principal peut utiliser l'article mentionné ci-dessous pour sa thèse. Aucune autre personne, incluant les autres co-premiers auteurs le cas échéant, ne pourra utiliser l'article dans une thèse ou un mémoire.**

Description du rôle de chacun des auteurs en commençant par l'auteur principal : tâches et responsabilité spécifiques, nature de la contribution à l'article (rédaction, expérimentation, figures, recherche bibliographique, etc.)

Yannève Rolland a effectué la recherche bibliographique, réalisé la totalité des expérimentations, analysé les résultats et écrit le manuscrit.

Le Dr. Michel Demeule a supervisé l'élaboration du plan expérimental relié à cet article. De plus, il a contribué à l'évaluation critique du manuscrit.

Le Dr. Laurence Fenart a fourni l'expertise quant au maintien et à l'utilisation du modèle de barrière hémato-encéphalique in vitro.

En tant que directeur de thèse, le Dr. Richard Béliveau a fourni l'encadrement professionnel, intellectuel et technique nécessaire à la réalisation de cet article.

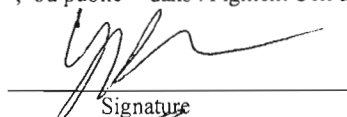
## ATTESTATION DE L'AUTEUR PRINCIPAL ET DU DIRECTEUR DE RECHERCHE

L'auteur principal de l'article intitulé :

**Inhibition of melanoma brain metastasis by targeting melanotransferrin at the cell surface.**

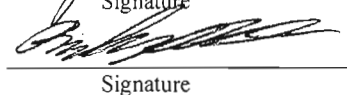
soumis pour publication ☒, accepté pour publication ☐ , ou publié dans : Pigment Cell and Melanoma Research  
est :

Auteur principal Yannève Rolland  
Nom

  
Signature

27-06-2008  
Date

Directeur de recherche Richard Béliveau  
Nom

  
Signature

27/06/08  
Date



**ACCEPTATION DES CO-AUTEURS POUR L'UTILISATION  
D'UN ARTICLE DANS UNE THÈSE**

**Note : Seul l'auteur principal peut utiliser l'article mentionné ci-dessous pour sa thèse. Aucune autre personne, incluant les autres co-premiers auteurs le cas échéant, ne pourra utiliser l'article dans une thèse ou un mémoire.**

Nous entérinons que Yannève Rolland

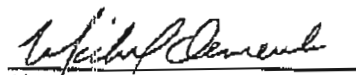
est l'auteur principal de l'article intitulé

Inhibition of melanoma brain metastasis by targeting melanotransferrin at the cell surface.

et qu'il peut l'utiliser pour sa thèse


Co-auteur(s)

1) Derneule, Michel  
Nom, prénom

  
Signature

27 juin 08  
Date

2) Fenart, Laurence  
Nom, prénom

  
Signature

04/07/08  
Date

3) Béliveau, Richard  
Nom, prénom

  
Signature

27/06/08  
Date

### 2.3 Inhibition of melanoma brain metastasis by targeting melanotransferrin at the cell surface

Yannève Rolland<sup>1</sup>, Michel Demeule<sup>2</sup>, Laurence Fenart<sup>3</sup> and Richard Béliveau<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>*Molecular Medicine Laboratory, Département d'Hémo-Oncologie, Hôpital Ste-Justine – Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, succursale Centre-ville, Montréal, H3C 3P8, Canada.*

<sup>2</sup>*AngioChem, 141 avenue du Président Kennedy, Bureau SB-5210, Montréal, H2X 3Y7, Canada.*

<sup>3</sup>*Blood-Brain Barrier Laboratory, Université d'Artois, EA 2465, IMPRT-IFR114, Faculté des Sciences Jean Perrin, rue Jean Souvraz, SP 18, 62307 Lens Cedex, France.*

**Running title:** Melanotransferrin promotes brain metastasis

**Correspondence should be addressed to:** Yannève Rolland, Laboratoire de Médecine Moléculaire, Service d'Hémo-Oncologie, Hôpital Ste-Justine-UQAM, C.P. 8888, Succursale Centre-ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8. Fax : 514-987-0246. Tel : 514-987-3000 #6697. E-mail : [rollandyann@hotmail.com](mailto:rollandyann@hotmail.com)

## RÉSUMÉ

Les métastases cérébrales représentent une étape cruciale du développement des mélanomes malins et sont généralement associées à un mauvais pronostic. La mélanotransferrine (MTf), un antigène associé à la membrane des cellules de mélanomes, promeut l'invasion cellulaire. Cette étude vise à évaluer le rôle de la MTf membranaire dans le développement de métastases cérébrales de mélanomes. Des cellules exprimant la MTf humaine ont été détectées dans les cerveaux de souris immunodéficientes ayant reçu une injection intraveineuse de cellules de mélanomes humains (SK-Mel 28). Par ailleurs, l'administration d'une dose unique d'un anticorps monoclonal reconnaissant la MTf humaine (L235) réduit significativement le développement de métastases cérébrales à partir de cellules de mélanomes SK-Mel 28. Les résultats *in vitro* indiquent que l'expression de la MTf à la surface des cellules de mélanomes est directement reliée à leur capacité à traverser l'endothélium d'un modèle de barrière hémato-encéphalique (BHE). L'ensemble des données démontrent que la MTf membranaire est un facteur important dans la migration transendothéliale des mélanomes à travers la BBB et la formation de métastases cérébrales subséquentes. En conclusion, cette étude suggère que la MTf membranaire représente une cible intéressante et démontre le potentiel thérapeutique d'un anticorps anti-MTf pour contrôler la formation de métastases cérébrales à partir de mélanomes.

## SUMMARY

Brain metastases are a common feature of malignant melanoma and are associated with poor prognosis. Melanotransferrin (MTf), one of several antigens associated with the surface of melanoma cells, has been demonstrated to promote cell invasion. In this study, we investigated the role of membrane-bound MTf in several of the steps leading to development of melanoma brain metastasis. Our results indicated that MTf-positive cells were detected in the brains of nude mice injected intravenously with human melanoma SK-Mel 28 cells. Moreover, administration of a single dose of a monoclonal antibody (L235) directed against human MTf significantly reduced the development of human melanoma brain metastases in nude mice. The ability of melanoma cells to cross the blood-brain barrier (BBB) *in vitro* is correlated with their MTf expression levels at the cell surface. Overall, our results indicated that membrane-bound MTf is a key element in melanoma cell transmigration across the BBB and subsequent brain metastasis. Thus, these data suggest MTf as an attractive target for treatment and demonstrate the therapeutic potential of an anti-MTf mAb for preventing metastatic melanoma.

**Keywords:** Melanoma, metastasis, melanotransferrin, blood-brain barrier, plasminogen.

## SIGNIFICANCE

The present study evaluated the contribution of melanotransferrin to the formation of melanoma brain metastasis. Melanotransferrin (MTf) was first identified as an antigen of melanoma cells and has more recently been reported to stimulate plasmin formation and thus cell invasion. Results presented here show that MTf over-expression is closely related to the capacity of melanoma cells to transmigrate across the blood-brain barrier *in vitro* in order to produce brain metastases. We also demonstrate that the administration of a monoclonal antibody directed against human MTf significantly reduced the development of melanoma brain metastases in nude mice. Overall, our results suggest that MTf participates in the establishment of melanoma brain metastases, and that membrane-bound MTf is a promising target for preventing tumour progression.

## INTRODUCTION

Brain metastases represent an important cause of morbidity and are the most common intracranial tumours in adults. Recent population-based data suggest that 10–30% of cancer patients exhibit clinical signs of metastasis to the brain whereas 80% are shown to have metastatic brain tumours at autopsy (Barnholtz-Sloan et al., 2004). The majority of brain metastases originate from one of the three primary malignancies: lung cancer (40–50%), breast cancer (15–25%), and melanoma (5–20%). Amongst these, melanoma has the highest propensity to metastasize to the brain (Wen and Loeffler, 2001). Limited therapeutic success in the treatment of central nervous system (CNS) neoplasia with chemotherapy is generally attributed to natural or acquired resistance to chemotherapy expressed by tumour cells, and to delivery impediment related to the blood–brain barrier (BBB).

Interposed between the circulatory system and the CNS, the BBB is composed of a continuous, non-fenestrated endothelium lining the cerebral microvasculature and is an important mechanism for maintaining homeostasis in the brain microenvironment (Bart et al., 2000). The development of the BBB is influenced by the astrocytic glia and pericytes, and leads to endothelial cells (EC) with unique permeability characteristics both due to high electrical resistance and to the expression of specific transporters (Dermietzel and Krause, 1991; Risau and Wolburg, 1990). Once tumour cells have invaded the BBB to establish a brain metastasis, the ECs now comprise a blood–tumour barrier. Little is known concerning this barrier in either human or animal models. Although a number of alterations in the brain capillary ultrastructure have been described in primary and metastatic brain tumours (Stewart, 1994), a normal BBB can co-exist with brain metastases (Bertossi et al., 1997). Hence, one hallmark of brain metastases is the oedema that surrounds the tumour, an effect possibly caused by altered permeability of tumour-associated ECs permitting greater leakage of fluid into the tumour (Lesniak and Brem, 2004).

To produce brain metastases, tumours progress through several steps including: reaching the brain vasculature through a process named intravasation, attaching to the endothelial wall, extravasating into the brain parenchyma, proliferating and inducing neoangiogenesis (Fidler et al., 2002). The plasminogen activation system plays a crucial role not only in blood clot lysis (Pawse and Tarachand, 1997) but also in various physiological and pathological events where localized proteolysis is required, such as inflammation (Del

Rosso et al., 2008), tissue remodelling and tumour metastasis (Andreasen et al., 2000). Plasmin is a key component of the fibrinolytic system that is capable of degrading, directly or through the activation of matrix metalloproteinases (MMPs), most of the major protein components of the extracellular matrix. Matrix degradation attributed to MMP-2 and MMP-9 (also known as gelatinase-A and -B, respectively) has been shown to play an important role in the progression of diseases such as atherosclerosis (Galis et al., 1995), inflammation (Romanic and Madri, 1994), tumour growth and metastasis (Hofmann et al., 2003).

Melanotransferrin (MTf), first identified in human melanoma, has been found to play an important role in numerous processes associated with tumour development and angiogenesis (Demeule et al., 2003; Michaud-Levesque et al., 2005a,b, 2007a; Rolland et al., 2007). MTf can either be associated with the cell membrane by a glycosyl phosphatidylinositol anchor or secreted into the extracellular environment in trace amounts (Brown et al., 1981). Studies have shown that the most pronounced MTf expression in normal tissues was within the epidermis of the skin, the brain endothelium, the kidney tubules and the ducts of sweat and salivary glands (Rothenberger et al., 1996; Sekyere et al., 2005). Expressed only slightly in normal tissues, MTf is present in much larger amounts in neoplastic cells and foetal tissues (Brown et al., 1981). We previously reported that MTf interaction with plasminogen modulates plasmin formation and stimulates cell motility (Demeule et al., 2003; Michaud-Levesque et al., 2005a). In addition, MTf is involved in melanoma cell proliferation and subcutaneous tumour growth (Bertrand et al., 2007; Dunn et al., 2006).

In this study, we evaluated the contribution of MTf in the development of brain metastases from melanoma. We show that MTf targeting by a monoclonal antibody (mAb L235) reduced brain metastasis from SK-Mel 28 cells in nude mice. The results presented here also indicate that transendothelial migration of cancer cells across an *in vitro* BBB model is correlated with MTf expression levels at their cell surface. Altogether, our results strongly suggest that membrane-bound MTf targeting may represent a promising therapeutic approach in preventing development of brain metastases.

## Results

### Expression of MTf at the cell surface increases cell invasion *in vivo*

The expression of membrane-bound MTf in CHO cells was previously reported to stimulate cell migration and invasion *in vitro* (Michaud-Levesque et al., 2005a). Hence, an *in vivo* invasion assay was used to determine the ability of MTf-transfected cells to penetrate distant organs from the blood circulation. CHO Mock and MTf-transfected cells were radiolabelled with [ $^3$ H]-thymidine and injected into Crl:CD-1 mice tail veins. After 24 h, the distribution of [ $^3$ H]-thymidine in mice tissues was determined using Ultima Gold™ liquid scintillation cocktail and Packard liquid scintillation analyzer from Perkin Elmer (Woodbridge, Canada). Figure 1 shows that the amount of radioactivity in brain and lungs was significantly increased when mice were injected intravenously (i.v.) with MTf-transfected CHO cells. More precisely, MTf expression at the surface of CHO cells increased brain and lung invasion by 7- and 9-fold, respectively. The radioactivity levels detected in kidney, heart and liver were similar whether mice were injected with Mock or with MTf-transfected CHO cells (Figure 1). These results suggest that invasion of MTf-expressing cells to the brain over a short-term period could promote the development of brain metastases over time.

### Intravenous injection of human melanoma cells leads to the development of brain metastasis in nude mice

To investigate whether MTf is involved in brain invasion of melanoma cells, we developed a quantitative assay to measure the presence of human MTf-expressing cells. Human melanoma SK-Mel 28 cells were injected i.v. into athymic nude mice and the content of human MTf-expressing cells was quantified in total brain after 8, 16 and 24 weeks. MTf-positive cells were only detected in brains of mice, which received the injection of tumour cells 24 weeks earlier. During this period of time, mice did not show any symptom or indication of brain metastasis, such as weight loss, dehydration or arched position. Flow cytometric analysis using mAb L235 demonstrated that human MTf could be detected in brain homogenates of mice injected with SK-Mel 28 cells (Figure 2A). As this mAb specifically recognizes human MTf, this signal can be attributed to human MTf expressed at the surface of melanoma cells. Results obtained by fluorescence-activated cell-sorting (FACS) analysis indicated that the mean fluorescence intensity associated with the detection



of MTf-positive cells was increased by 25% in brain homogenates from mice injected i.v. with melanoma cells (Figure 2B). Other organs (i.e. lungs, liver and kidneys) from mice injected with SK-Mel 28 cells were also analysed using FACS. However, in contrast to the brain, MTf-expressing cells were undetectable (data not shown). To confirm the MTf-detection specificity, excess soluble MTf (sMTf) was added during mAb staining. The added sMTf completely blocked staining by the mAb L235, indicating that it is specific to MTf present in the brain homogenates (Figure 2).

#### **Single dose of mAb L235 reduces melanoma brain metastasis in nude mice**

To confirm and validate that membrane-bound MTf is associated with SK-Mel 28 cell invasion in vivo, we evaluated the effect of mAb L235 on the establishment of melanoma brain metastasis in mice. Human melanoma SK-Mel 28 cells were injected i.v. into female athymic nude mice treated (or not) with either mAb L235 or an IgG<sub>1</sub> control isotype. The content of melanoma cells, defined as human MTf-expressing cells, was determined using flow cytometry (Figure 3A). The administration of a single dose of mAb L235 intraperitoneally (i.p.) at 20 mg/kg was sufficient to reduce by half the level of human melanoma MTf-expressing cells in mouse brain when compared with brain from untreated or IgG<sub>1</sub>-treated mice (Figure 3B). Overall, these results show that a single dose of mAb L235 can reduce the development of brain metastases from SK-Mel 28 human melanoma cells.

#### **Pharmacokinetic characteristics of mAb L235**

Plasma levels of mAb L235 were measured following a single i.p. injection of [<sup>125</sup>I]-L235 (20 mg/kg) into female athymic nude mice. The mean plasma concentrations of mAb L235 were plotted as a function of time (Figure 4). The pharmacokinetic parameters derived from these data are summarized in Table 1. Monoclonal antibody L235 was detected in the circulation 10 min after its i.p. injection. The maximum concentration ( $C_{\max}$ ) of 0.17 µg/ml (1.1 µM) was reached 24 h later and the terminal half-life ( $t_{1/2}$ ) was 115 h (~5 days). The high area under curve ( $AUC_{0-360}$ ) of 45.5 µg\*h/ml for the mAb L235 also indicate that its plasma concentration remains stable for a relatively long period of time (Table 1). In addition, the ability of mAb L235 in mouse plasma to bind to MTf was confirmed by Western blot analysis (data not shown). Similar levels of recombinant MTf were detected with original mAb L235 and with mouse plasma collected at 6, 24, 48 and 72 h after i.p. mAb administration.

### **MTf expression correlates with increased cell transmigration across the blood-brain barrier *in vitro***

We next evaluated the migration of MTf-expressing cells across the BBB using an *in vitro* model consisting of brain capillary EC (BCEC) co-cultured with glial cells. This model presents ultrastructural features characteristic of brain endothelium, including tight junctions, lack of fenestration and transendothelial channels, low permeability for hydrophilic molecules and a high electrical resistance (Dehouck et al., 1990). Cell transmigration across this BBB *in vitro* model was evaluated for several cell lines expressing different levels of MTf. Western blot analysis revealed that SK-Mel 28 and A2058 cells express higher levels of MTf among melanoma cell lines, when compared with A101D cells (Figure 5A). Meanwhile, MTf protein expression was undetected in A375 melanomas and CHO Mock cells. As previously reported (Demeule et al., 2003), Western blot analysis allowed detection of two bands at 73 and 60 kDa in human melanoma SK-Mel 28 cells.

Cell transmigration across the *in vitro* BBB model was monitored by fluorescent cell staining with bisbenzimidazole (Hoechst 33342; Sigma-Aldrich, Oakville, ON, USA), a molecule that becomes fluorescent after binding to DNA. Cell staining first revealed that the four cell types used were labelled equally with bisbenzimidazole in a very short period of time, and that the fluorescence remained stable over 72 h (data not shown). Fluorescent cells were then loaded onto the BCEC monolayer and cells that had transmigrated to the basolateral side of the filter were visualized using fluorescence microscopy after 48 h (Figure 5B). The quantification of transmigrated fluorescent cells shows that SK-Mel 28 and MTf-transfected CHO cells had migrated through the BBB to a greater extent than had other cell lines (Figure 5C). More specifically, the transendothelial migration of MTf-transfected CHO cells was significantly increased by threefold when compared with Mock cells. Results also showed that SK-Mel 28 and MTf-transfected CHO cells had an equivalent ability to cross the BCEC monolayer. Figure 5C indicates that melanoma cells expressing higher levels of MTf, such as SK-Mel 28 and A2058, are more likely to cross the BBB, with nearly twice as much transmigrated cells than non-expressing cells. To that end, A375 melanoma cells and CHO Mock cells have similar levels of transmigration (Figure 5C).

### **Monoclonal antibody L235 reduces transendothelial migration of MTf-expressing cells across the BBB**

We selected three cell lines with the most abundant MTf expression (SK-Mel 28, A2058 and MTf-transfected CHO cells) in order to fully evaluate the contribution of membrane-bound MTf in cell transmigration across the BBB *in vitro* model. Cells were incubated with a monoclonal antibody (mAb) and loaded onto BCEC monolayer. Figure 6A shows that the transmigration of fluorescent MTf-transfected CHO cells is significantly reduced by mAb L235, while the transmigration of Mock CHO cells was unaffected. Quantification of cell transmigration indicate that mAb L235 diminished the migration of MTf-transfected CHO cells by 50%, nearly to the basal level seen with Mock CHO cells (Figure 6B). Therefore, the presence of the mAb L235 inhibited the transendothelial migration of MTf-expressing melanoma cells, SK-Mel 28 and A2058 cells, by nearly 50% when compared to an IgG<sub>1</sub> control isotype (Figure 6C).

#### **Down-regulation of MTf expression decreases melanoma cell transmigration across the BBB**

To verify that MTf is a key player in melanoma cell transmigration across the BBB, the expression of MTf was downregulated by post-transcriptional gene silencing (siRNA). The efficacy of MTf-specific siRNA was first determined by Western blot analysis. SK-Mel 28 and A2058 cells transfected with siRNA targeting MTf expression show a significant reduction (respectively by 70 and 60%) in MTf protein expression when compared to cells transfected with non-specific siRNA (control siRNA) or to non-transfected cells (Figure 7A). In addition, real-time PCR analysis indicates that mRNA expression of MTf was reduced by 80 and 60% respectively in SK-Mel 28 and A2058 melanoma cells transfected with MTf siRNA (Figure 7B).

Following this, the ability of MTf-silenced melanoma cells to transmigrate across the BBB *in vitro* was determined. We found that transendothelial migration of SK-Mel 28 cells with low levels of MTf expression was decreased by nearly 80% when compared with non-transfected cells or to melanoma cells transfected with control siRNA (Figure 7C). Similar results were obtained with A2058 melanoma cells, where siRNAs targeting MTf expression succeed to reduce by 70% the transmigration of A2058 cells across the BBB *in vitro* model (Figure 7C). The integrity of the BBB was studied by monitoring the diffusion of sucrose during the transmigration of SK-Mel 28 melanoma cells (data not shown). While the permeability of sucrose was increased during the transmigration of melanoma cells, it was

unaffected and maintained at basal levels during the transmigration of melanoma cells transfected with MTF-siRNA.

### **Participation of plasmin and MMPs during the MTF-dependent transmigration process**

The activation of plasminogen into plasmin is a key feature in tumour cell invasion and metastasis (Skrzydłowska et al., 2005). As MTF can stimulate the activation of plasminogen (Demeule et al., 2003; Michaud-Levesque et al., 2005a), we evaluated the importance of this system during the transmigration of MTF-expressing cells across the BBB *in vitro*. In the presence of  $\alpha_2$ -antiplasmin ( $\alpha_2$ -AP), the transendothelial migration of SK-Mel 28 human melanoma cells was impeded by more than 75% when compared to control conditions (Figure 8A, left panel). While  $\alpha_2$ -antiplasmin is known to prevent plasminogen activation and to inhibit the proteolytic activity of plasmin, epsilon aminocaproic acid (EACA) mimics the side chain of lysine and interacts with plasminogen lysine-binding sites (Castellino et al., 1981). When added to the assay, EACA reduced the transendothelial migration of SK-Mel 28 cells by 50%. A similar degree of inhibition was also obtained in the presence of sMTf (Figure 8A, left panel), which is thought to compete with the binding of plasminogen to endogenous membrane bound MTF.

Once formed, plasmin stimulates extracellular matrix degradation by activating pro-MMPs (Skrzydłowska et al., 2005). Treatment of SK-Mel 28 melanoma cells with GM6001, a broad range MMP inhibitor, reduced the transendothelial migration of melanoma cells by 90% (Figure 8A, right panel). MMP-2 and MMP-9 are two major MMPs involved in cancer cells' invasion through the BBB. The presence of monoclonal antibodies directed against human MMP-2 and MMP-9 reduced the invasion of SK-Mel 28 cells by 40 and 75%, respectively, compared to the IgG<sub>1</sub> control condition (Figure 8A, right panel).

Transendothelial migration of MTF-transfected CHO cells was also significantly reduced (more than 50% reduction) by  $\alpha_2$ -AP, EACA and sMTf (Figure 8B, left panel). In addition, MTF-expressing CHO cells responded similarly to SK-Mel 28 cells in the presence of MMPs inhibitors and specific mAbs. Figure 8B (right panel) shows that anti-MMP-2 and anti-MMP-9 mAbs inhibit the transmigration of MTF-transfected CHO cells by 50 and 80% respectively, when compared to the isotype control condition. As observed with melanoma cells, the broadrange MMP inhibitor potently reduces the migration of CHO cells across the BBB *in vitro* model. These results indicate that plasmin as well as MMP-2 and MMP-9 are

involved in the MTF-dependent transendothelial migration.

## Discussion

Brain is a common site of metastasis from malignant melanoma (Posner, 1996). Among cell surface antigens of human malignant melanoma, there is a growing interest towards MTf. We demonstrate that MTf-expressing cells present a greater ability to cross the endothelium of an *in vitro* BBB model, when compared with non-expressing cell lines. Previous studies reported that SK-Mel 28 melanoma cells had between 3 and  $3.8 \times 10^5$  MTf sites/cell, while this number could reach  $1.2 \times 10^6$  MTf sites/cell in MTf-transfected CHO cells (Brown et al., 1981; Kennard et al., 1995). Among various human melanoma cell lines analyzed for cell-surface expression of MTf by quantitative FACS with mAb L235, SK-Mel 28 and A2058 cells expressed abundantly MTf with  $1.5 \times 10^5$  and  $1.45 \times 10^5$  L235 sites/cells (Smith et al., 2006). We already established a correlation between MTf expression and cell invasive potential (Demeule et al., 2003; Michaud-Levesque et al., 2005a). Indeed, results obtained by post-transcriptional gene silencing clearly indicate a relationship among MTf over-expression and melanoma cell transmigration across the BBB *in vitro*. Furthermore, results from *in vivo* invasion assay revealed that MTf-transfected cells are more likely to invade mice brains and lungs than Mock cells, suggesting that MTf expression could also facilitate cell invasion *in vivo*. The participation of MTf in melanoma cells' extravasation to the brain was next confirmed using a metastasis model. After reaching the blood vasculature, tumour cells need to accomplish several steps to successfully invade different tissue from a distant site. The identification of MTf-positive cells within nude mice brains after i.v. injection of SK-Mel 28 cells indicate that melanoma cells not only survived in the bloodstream, but also efficiently penetrated into the brain. Our findings are the first to demonstrate the involvement of MTf in melanoma cell invasion leading to the development of brain metastasis. It has already been suggested that MTf expression could modulate cell proliferation. Although MTf expression in CHO cells did not increase their proliferation (Kennard et al., 1995), *in vivo* studies using MTf down-regulated melanoma cells resulted in significantly reduced initiation and tumour growth in nude mice (Dunn et al., 2006). Hence, MTf over-expression at the surface of melanoma cells could thus facilitate their transmigration across the BBB and stimulate their proliferation after their invasion in the CNS.

The potent inhibition of MTf-expressing cells transmigration across the BCEC monolayer observed with several inhibitors of the plasminogen activation indicates that plasmin is a key player in MTf-dependent processes. As a plausible plasminogen receptor, membrane-bound MTf may stimulate the conversion of plasminogen into plasmin by recruiting plasminogen for its activation by cell-associated plasminogen activator (Michaud-Levesque et al., 2005a). Recently, the involvement of the fibrinolytic system in promoting melanoma cells to pass through the BBB has been demonstrated (Perides et al., 2006). We also previously reported that MTf could equally stimulate the activation of plasminogen by its tissular (Rolland et al., 2006) and urokinase type activators (uPA) (Demeule et al., 2003). As plasminogen activation acts as a trigger in matrix degradation and cell invasion, the stimulation of plasminogen activation by MTf at the surface of melanoma cells could certainly facilitate their extravasation to the brain. Moreover, interfering with MTf at the surface of tumour cells could regulate crucial steps leading to brain metastasis. Plasmin is an important protease that mediates vessel wall extracellular proteolysis (Stalboerger et al., 2001). In this study, results indicate that the permeability of the BBB to sucrose was temporarily increased during SK-Mel 28 cells transmigration, suggesting that plasmin generated at the surface of melanoma cells could locally degrade the BCEC monolayer and affect the BBB integrity. It has been shown that BBB integrity around small lesions, such as metastases, recovers after the passage of metastatic cells into the parenchyma (Fidler et al., 1999). Considering that BBB permeability to sucrose is restored after the transmigration of melanoma cells, we propose that this process is temporary and reversible.

The results presented in this study showed that sMTf affects the transmigration of MTf-expressing cells across the endothelial cell monolayer *in vitro*. We previously demonstrated that sMTf inhibits plasminogen binding at the cell surface by interacting with the zymogen in the surrounding media and thus reducing its availability in the vicinity of the cell (Michaud-Levesque et al., 2005a). Indeed, sMTf may regulate the motility of MTf-expressing melanoma cells by interfering with plasminogen activation. The participation of the fibrinolytic system during melanoma cell migration across has already been reported (Perides et al., 2006). Previous studies also reported that tPA and MMP-9 greatly affect the BBB integrity by stimulating perivascular tissue proteolysis (Aoki et al., 2002; Romanic and



Madri, 1994; Zhang et al., 2002). Low density lipoprotein receptor-related protein (LRP), a member of the LDL receptor family, was shown to mediate tPA and MMP-9 activity (Boucher et al., 2003; Bu et al., 1992; Hahn-Dantona et al., 2001; Yepes et al., 2003). Thus, in the presence of plasminogen, sMTf binds to the cell surface and undergo LRP-mediated endocytosis into cells (Michaud-Levesque et al., 2007b). In addition, sMTf modulates LRP protein expression in EC (Michaud-Levesque et al., 2005b). Based on these findings, sMTf could therefore target LRP-mediated proteolysis during cell transmigration across the BBB *in vitro*. Hence, these results raise the interesting possibility that sMTf may associate to LRP at the surface of the brain capillary endothelium and interfere with cancer cell invasion by maintaining the BBB integrity.

Interestingly, a single dose of mAb L235 significantly reduced melanoma brain metastasis in nude mice. Results presented in this study demonstrate that the administration of 20 mg/kg mAb L235 can achieve plasma concentrations that are sufficient to inhibit transmigration of melanoma cell *in vitro*. mAb L235 was reported to inhibit the binding and subsequent activation of plasminogen at the surface of MTf-expressing cells (Michaud-Levesque et al., 2005a). The binding of mAb L235 to MTf at the surface of melanoma cells could interfere with the activation of plasminogen at the vicinity of the cell and thus reduce their ability to digest the vessel wall matrix and extravasate to the brain. Chemotherapy has a limited role in treating brain metastases and areas for future research include the prevention of CNS metastasis by targeting circulating cancer cells through mAb-based therapy (Stern and Herrmann, 2005; Waldmann, 2003). Immunohistochemical analysis revealed that 62% of metastatic melanoma tumours had strong staining for MTf (Smith et al., 2006). Our findings suggest that an MTf-specific antibody could be used to prevent or limit the development of brain metastasis from primary melanoma. Overexpression of MTf in melanoma as compared with normal tissue, in conjunction with its implication in cell invasion, supports further evaluation of MTf-specific antibody for targeting MTf-overexpressing tumours. Moreover, MTf targeting by sMTf represents an interesting tool for intervening in tumour cells invasion. Thus, in addition to its inhibitory effects on cell invasion, sMTf treatment was also reported to impede the growth of subcutaneous lung cancer cells (Rolland et al., 2007). Considering that other type of cancer cells over-express MTf, one of which is the human lung carcinoma



NCI H460 cell line, the efficacy of MTf-specific mAb and sMTf could also be expanded to other cancers expressing MTf. Overall, the overexpression of MTf at the surface of cancer cells along with its participation in several key steps in tumour progression, make it a promising target in cancer therapy.

In conclusion, we provide clear evidence that MTf over-expression at the surface of melanoma cells facilitates their transmigration across the BBB and promotes their invasion to the CNS *in vivo* in order to produce brain metastases. In addition, we demonstrate that the transmigration of MTf-expressing cells across the BBB requires the participation of the plasminogen activation system. Overall, our results suggest that MTf expression could be a potential prognostic indicator for the development of brain metastases. Moreover, our findings indicate that membrane-bound MTf may represent an attractive target for the development of new cancer therapeutics.

## **Materials and Methods**

### **Materials**

Recombinant truncated sMTf (produced by introducing a stop codon following the glycine residue at position 711 of full-length MTf cDNA) and L235 mAb were kindly provided by Biomarin Pharmaceutical (Novato, CA, USA). Antibodies directed against human MMP-2 and MMP-9 as well as the chemical GM6001 were from Calbiochem (La Jolla, CA, USA). Alexa Fluor 488<sup>®</sup> conjugated antibodies were purchased from Invitrogen (Burlington, Canada). Chinese hamster ovarian (CHO) cells transfected with full-length human MTf cDNA (p97TRVb CHO cells; referred to as MTf-transfected cells in the text) or with control vector (TRVb CHO cells; referred to as Mock cells in the text) were from Dr Malcom Kennard of the University of British Columbia (Vancouver, Canada). Other biochemical reagents were from Sigma-Aldrich (Oakville, Canada). Specific pathogen-free female athymic Crl:CD-1<sup>®</sup>-nuBR nude mice and male Crl:CD-1 mice were obtained from Charles River Laboratories (LaSalle, Canada).

### **Cell culture**

Human skin malignant melanoma SK-Mel 28 cells were cultured in minimal essential medium (MEM) supplemented with 1 mM pyruvate and 10% calf serum (CS). Human melanoma cells A101D and A375 were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% CS. Human A2058 melanoma cells were cultured in DMEM medium containing 1 mM pyruvate and 10% CS. CHO cells (Mock and MTf-transfected) were maintained in F12 medium containing 1 mM Hepes and 10% CS. Cells were grown at 37°C under 5% CO<sub>2</sub>/95% air atmosphere. EC from bovine brain capillaries (BCECs) were cultured in DMEM supplemented with heat-inactivated 10% horse (v/v) and 10% CS, 2 mM glutamine, 50 µg/ml gentamycin, and 1 ng/ml basic fibroblast growth factor, added every other day. Primary cultures of mixed astrocytes were prepared from newborn rat cerebral cortex (Dehouck et al., 1992). Briefly, after removing the meninges, the brain tissue was gently forced through an 82-µm nylon sieve. Astrocytes were plated on six-well microplates at a concentration of  $1.2 \times 10^5$  cells/ml in 2 ml of optimal culture medium (DMEM) supplemented with 10% heat-inactivated foetal CS.

### BBB model

The *in vitro* model of the BBB was established by using a co-culture of BCECs and newborn rat astrocytes as previously described (Dehouck et al., 1992). Briefly, prior to cell co-culture, plate inserts (Millicell-PC 3.0  $\mu\text{m}$ ; 30-mm diameter; Millipore, Bedford, MA, USA) were coated on the upper side with rat tail collagen. They were then set in the six-multiwell microplates containing astrocytes prepared as described above, and BCECs were plated on the upper side of the filters in 2 ml of co-culture medium. BCEC medium was changed three times a week. Under these conditions, differentiated BCECs formed a confluent monolayer 7 days later. Experiments were performed 5–7 days after confluence was reached. The number of cells at confluence was 400 000 cells/4.2  $\text{cm}^2$  or 90  $\mu\text{g}$  of protein/4.2  $\text{cm}^2$ , as evaluated by a micro-BCA assay (Pierce, Rockford, IL, USA). At this point, the permeability coefficient for sucrose attained 0.3–0.5  $\text{cm}/\text{min}$  as previously described by Dehouck et al. (1992).

### Transendothelial migration assay

Cells from melanoma as well as CHO (Mock and MTf-transfected) cells were trypsinized, incubated for 5 min in 10  $\mu\text{M}$  bisbenzimidazole (Hoescht 33342) and washed three times in  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -free phosphate-buffered saline (PBS) solution. Fluorescent cells ( $1 \times 10^5$  cells) were loaded onto a BCEC monolayer. Transendothelial migration was performed at 37°C under 5%  $\text{CO}_2$ /95% air atmosphere in fresh medium supplemented with (or lacking) recombinant truncated MTf (sMTf; 100 nM),  $\alpha_2$ -antiplasmin ( $\alpha_2$ -AP; 150 nM),  $\epsilon$ -aminocaproic acid (EACA; 1  $\mu\text{M}$ ) and GM6001 (10  $\mu\text{M}$ ). The inhibitory effects of monoclonal antibodies directed against MTf (L235; 50 nM) and matrix metalloproteinase-2 or -9 (anti-MMP-2 and anti-MMP-9; 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) were also tested.

After 48 h, cells were washed with  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -free PBS solution and fixed during 30 min in 3.7% paraformaldehyde. Filter tops were cleaned with cotton swabs and cells that had migrated to the other side were visualized and photographed at an original magnification of  $\times 40$  using a Retiga 1300 camera attached to a NIKON Eclipse TE2000-U microscope (Nikon; Mississauga, Canada). The quantification of transmigrated cells was performed using Northern Eclipse software (Empix Imaging, Mississauga, Canada) by counting at least 10 random fields for each filter.

### **Post-transcriptional gene silencing**

Transfection of SK-Mel 28 and A2058 cells with siRNA was performed as suggested in the standard procedure from Qiagen (Mississauga, Canada). Shortly before transfection, SK-Mel 28 cells were seeded onto 60-mm dishes ( $1 \times 10^5$  cells/dish) in complete fresh medium at 37°C under a 5% CO<sub>2</sub>/95% air atmosphere. Non-specific (siCTL) or MTf-specific siRNA (siMTf; gene accession number M12154): sense r(GGGCGAAGUGUACGAUCAA)dTdT and antisense r(UUGAUCGUACACUUCGCCC)dAdC were diluted in serum-free culture medium to obtain a final concentration of 50 nM and mixed with HiPerFect Transfection Reagent (Qiagen). The mixture was mixed and added drop-wise onto the cells. Cells were then incubated with siRNAs during 48 h at 37°C under a 5% CO<sub>2</sub>/95% air atmosphere.

### **Western blot analysis**

CHO cells (Mock and MTf-transfected), SK-Mel 28 (transfected or not with siRNA) and A375 melanoma cells were solubilized on ice in a lysis buffer (Michaud-Levesque et al., 2005b). Proteins were separated by SDS-PAGE and blotted onto a polyvinylidene difluoride membrane (PVDF) (Perkin-Elmer Life Sciences, Boston, MA, USA). Following transfer, the immunodetection of MTf was performed using mAb L235 (which recognizes a conformational epitope on human MTf). The immunodetection of GAPDH was used as a loading control. Proteins were quantified by laser densitometry using a Chemilmager™ 5500 from Alpha Innotech Corporation (San Leandro, CA, USA).

### **RNA isolation and real-time PCR analysis**

Total RNA from SK-Mel 28 and A2058 cells was extracted using TRIzol™ reagent from Invitrogen and quantified using a spectrophotometer. Reverse-transcription reactions were performed using 1 µg of total RNA and a High-Capacity cDNA archive kit from Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). The transcript expression of MTf and 18 S RNA were studied using 1 µg and 25 ng of cDNA, respectively. Real time-PCR reactions were performed using the IQ™ SYBR green Supermix and iQ5™ Real Time Detection System from Bio-Rad Laboratories (Mississauga, Canada). Specific primers used in this study were designed with MacVector™ software (MacVector Inc.; Cary, NC, USA) according to cDNA sequences deposited at the NCBI data bank. Specific human MTf primers used are as follows: 5'-CCCTAAGTGGCGAGGACATTTAC-3' and 5'-TCATCCAAGGT

GAAGGCGTG-3'. The relative quantification was normalized to the 18S ribosomal subunit gene expression level (5'- CGGCTACCACATCCAAGGAA-3' and 5'-GCTGGAATTACCG CGGCT-3').

### **In vivo invasion assay**

The *in vivo* invasion assay was based on the method of Muto (Muto et al., 2003) with minor modifications (Bertrand et al., 2007). All animal studies were conducted in accordance with recommendations from the Canadian Council on Animal Care (CCAC) for care and use of experimental animals. Briefly, CHO Mock and MTf-transfected cells were incubated with [<sup>3</sup>H]-thymidine for 48 h and injected ( $5 \times 10^5$  cells) into the tail vein of 5 to 10-week-old male Crl:CD-1 mice. After 24 h, mice were anesthetized with ketamine/xylazine (120/10 mg/kg i.p.) and the heart was exposed by opening the thorax. A 18-gauge cannula with a sharp wedge was inserted into the left ventricle of the heart and mice were perfused for 10 min with Ringer/Hepes buffer. The posterior vena cava was cut, allowing the fluid to exit. The perfusion syringe was driven by a Harvard pump (model PHD 2000; Harvard Apparatus, Saint-Laurent, Canada) at the rate of 2 ml/min. Afterward, the organs were removed, minced and solubilized with Solvable™ (Perkin Elmer; Woodbrige, Canada) for 18 h at 37°C. The amount of [<sup>3</sup>H] was measured using liquid scintillation spectrometry.

### **Pharmacokinetic parameters determination**

Monoclonal antibody L235 was radio-iodinated by standard procedures using Na-[<sup>125</sup>I] (Amersham Pharmacia Biotech, Baie D'Urfé, Canada) and an Iodo-beads kit from Pierce Chemical Co. (Rockford, IL, USA). Female athymic Crl:CD-1®-nuBR nude mice (aged 5-10 weeks) received a single dose of 20 mg/kg mAb [<sup>125</sup>I]-L235 in a saline solution by i.p. administration (100 µl; 33 µM;  $3.5 \times 10^5$  CPM). At the allotted times, blood samples were withdrawn from the tail vein into a heparinized Microvette CB 300 LH container (Sarstedt, Nümbrecht, Germany). The concentration of mAb L235 was quantified by measuring plasma-associated radioactivity using a gamma counter. Peak plasma concentration ( $C_{max}$ ), time of peak plasma concentration ( $t_{max}$ ), elimination half-life ( $t_{1/2}$ ), area under the concentration–time curve (AUC), volume of distribution (Vd) and the clearance (CL) were calculated using the software program PK Solutions 2.0 (Montrose, CO, USA).

### **Metastasis assay**

Human melanoma SK-Mel 28 cells were harvested and resuspended in complete culture medium. Cells were washed three times with  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -free PBS solution and the final pellet was resuspended to obtain  $1 \times 10^6$  cells/50  $\mu\text{l}$ . Specific pathogen-free, female athymic Crl:CD-1<sup>®</sup>-nuBR nude mice (aged 5–10 weeks) were injected in the tail vein with  $1 \times 10^6$  SK-Mel 28 cells. After 24 weeks, mice brains were removed and their content of MTF-expressing cells was analyzed using flow cytometry. To evaluate the effect of mAb L235 in melanoma brain metastasis, IgG<sub>1</sub> or mAb L235 (20 mg/kg) were administered i.p. 6 h before the injection of melanoma tumour cells into nude mice.

### **FACS analysis**

Mice brains from the in vivo metastasis assay were dissected and homogenized on ice in Ringer/Hepes buffer containing 0.5% bovine serum albumin (BSA) with a glass homogenizer. Samples were then incubated with collagenase A (1 mg/ml) for 45 min at 37°C under a 5%  $\text{CO}_2$ /95% air atmosphere with agitation. Cell suspensions were passed through 180- $\mu\text{m}$  and 30- $\mu\text{m}$  Nitex filters. The pellets were washed three times in a  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -free PBS solution containing 0.5% BSA and 2 mM ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA). The final pellets ( $1 \times 10^6$  cells) were resuspended in a binding buffer (10 mM Hepes, 140 mM NaCl, 2.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 7.4) and incubated at 4°C for 30 min with 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of either mAb L235 or IgG<sub>1</sub> control isotype. Cells were washed twice and incubated at 4°C for 30 min with 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 488 conjugated antibody. Cells (50 000 events) were then analyzed using flow cytometry on a Becton Dickinson FACS Calibur flow cytometer equipped with CellQuest Pro software (BD Bioscience; Mississauga, Canada). The fluorescence of cell population expressing human membrane-bound MTF was corrected for the background fluorescence intensity measured in the presence of a non-specific IgG<sub>1</sub> and was expressed as mean fluorescence intensities. The specificity of the signal associated with MTF was verified by adding 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of the truncated sMTf during primary antibody incubation.

### **Statistical analysis**

Statistical analysis was performed by one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's multiple comparison test using GraphPad Prism (San Diego, CA, USA). The resulting P-values designate the level of significance and are designated by \*for  $P < 0.01$ ,

\*\*for  $P < 0.005$  and \*\*\*for  $P < 0.001$ . When applicable, results are presented as mean  $\pm$  SE.

### **Acknowledgments**

This study was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and by research funding from Gestion Valeo s.e.c. and Valorisation-Recherche Québec to R. Béliveau. Dr. Béliveau holds a Research Chair in Cancer Prevention from Université du Québec à Montréal (UQÀM) and a Research Chair in Neurosurgery (Chaire de Neurochirurgie Claude-Bertrand) from Centre Hospitalier de l'Université de Montréal. Y. Rolland is a recipient of a Ph.D scholarship from NSERC. The authors YR, MD and RB hold a patent related to the work that is described in this manuscript (Pat. #WO2004099410). We thank Dr. Anthony Régina for his critical reading. We also greatly appreciate the technical support of Normand Lapierre and Julie Poirier.

## REFERENCES

- Andreasen, P.A., Egelund, R., and Petersen, H.H. (2000). The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. *Cell. Mol. Life Sci.* **57**, 25–40.
- Aoki, T., Sumii, T., Mori, T., Wang, X., and Lo, E.H. (2002). Blood-brain barrier disruption and matrix metalloproteinase-9 expression during reperfusion injury: mechanical versus embolic focal ischemia in spontaneously hypertensive rats. *Stroke* **33**, 2711–2717.
- Barnholtz-Sloan, J.S., Sloan, A.E., Davis, F.G., Vignea, F.D., Lai, P., and Sawaya, R.E. (2004). Incidence proportions of brain metastases in patients diagnosed (1973 to 2001) in the Metropolitan Detroit Cancer Surveillance System. *J. Clin. Oncol.* **22**, 2865–2872.
- Bart, J., Groen, H.J., Hendrikse, N.H., Van Der Graaf, W.T., Vaalburg, W., and De Vries, E.G. (2000). The blood-brain barrier and oncology: new insights into function and modulation. *Cancer Treat. Rev.* **26**, 449–462.
- Bertossi, M., Virgintino, D., Maiorano, E., Occhiogrosso, M., and Roncali, L. (1997). Ultrastructural and morphometric investigation of human brain capillaries in normal and peritumoral tissues. *Ultrastruct. Pathol.* **21**, 41–49.
- Bertrand, Y., Demeule, M., Michaud-Levesque, J., and Beliveau, R. (2007). Melanotransferrin induces human melanoma SK-Mel-28 cell invasion *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **353**, 418–423.
- Boucher, P., Gotthardt, M., Li, W.P., Anderson, R.G., and Herz, J. (2003). LRP: role in vascular wall integrity and protection from atherosclerosis. *Science* **300**, 329–332.
- Brown, J.P., Woodbury, R.G., Hart, C.E., Hellstrom, I., and Hellstrom, K.E. (1981). Quantitative analysis of melanoma-associated antigen p97 in normal and neoplastic tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**, 539–543.
- Bu, G., Williams, S., Strickland, D.K., and Schwartz, A.L. (1992). Low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor is an hepatic receptor for tissue-type plasminogen activator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 7427–7431.
- Castellino, F.J., Ploplis, V.A., Powell, J.R., and Strickland, D.K. (1981). The existence of independent domain structures in human Lys77-plasminogen. *J. Biol. Chem.* **256**, 4778–4782.
- Dehouck, M.P., Meresse, S., Delorme, P., Fruchart, J.C., and Cecchelli, R. (1990). An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood-brain barrier *in vitro*. *J.*



- Neurochem.* **54**, 1798–1801.
- Dehouck, M.P., Jolliet-Riant, P., Bree, F., Fruchart, J.C., Cecchelli, R., and Tillement, J.P. (1992). Drug transfer across the blood-brain barrier: correlation between *in vitro* and *in vivo* models. *J. Neurochem.* **58**, 1790–1797.
- Del Rosso, M., Fibbi, G., Pucci, M., Margheri, F., and Serrati, S. (2008). The plasminogen activation system in inflammation. *Front. Biosci.* **13**, 4667–4686.
- Demeule, M., Bertrand, Y., Michaud-Levesque, J., Jodoin, J., Rolland, Y., Gabathuler, R., and Beliveau, R. (2003). Regulation of plasminogen activation: a role for melanotransferrin (p97) in cell migration. *Blood* **102**, 1723–1731.
- Dermietzel, R., and Krause, D. (1991). Molecular anatomy of the blood-brain barrier as defined by immunocytochemistry. *Int. Rev. Cytol.* **127**, 57–109.
- Dunn, L.L., Sekyere, E.O., Rahmanto, Y.S., and Richardson, D.R. (2006). The function of melanotransferrin: a role in melanoma cell proliferation and tumorigenesis. *Carcinogenesis* **27**, 2157–2169.
- Fidler, I.J., Schackert, G., Zhang, R.D., Radinsky, R., and Fujimaki, T. (1999). The biology of melanoma brain metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* **18**, 387–400.
- Fidler, I.J., Yano, S., Zhang, R.D., Fujimaki, T., and Bucana, C.D. (2002). The seed and soil hypothesis: vascularisation and brain metastases. *Lancet Oncol.* **3**, 53–57.
- Galis, Z.S., Sukhova, G.K., and Libby, P. (1995). Microscopic localization of active proteases by in situ zymography: detection of matrix metalloproteinase activity in vascular tissue. *FASEB J.* **9**, 974–980.
- Hahn-Dantona, E., Ruiz, J.F., Bornstein, P., and Strickland, D.K. (2001). The low density lipoprotein receptor-related protein modulates levels of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) by mediating its cellular catabolism. *J. Biol. Chem.* **276**, 15498–15503.
- Hofmann, U.B., Eggert, A.A., Blass, K., Brocker, E.B., and Becker, J.C. (2003). Expression of matrix metalloproteinases in the microenvironment of spontaneous and experimental melanoma metastases reflects the requirements for tumor formation. *Cancer Res.* **63**, 8221–8225.
- Kennard, M.L., Richardson, D.R., Gabathuler, R., Ponka, P., and Jefferies, W.A. (1995). A novel iron uptake mechanism mediated by GPI-anchored human p97. *EMBO J.* **14**, 4178–4186.

- Lesniak, M.S., and Brem, H. (2004). Targeted therapy for brain tumours. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**, 499–508.
- Michaud-Levesque, J., Demeule, M., and Beliveau, R. (2005a). Stimulation of cell surface plasminogen activation by membrane-bound melanotransferrin: a key phenomenon for cell invasion. *Exp. Cell Res.* **308**, 479–490.
- Michaud-Levesque, J., Rolland, Y., Demeule, M., Bertrand, Y., and Beliveau, R. (2005b). Inhibition of endothelial cell movement and tubulogenesis by human recombinant soluble melanotransferrin: involvement of the u-PAR/LRP plasminolytic system. *Biochim. Biophys. Acta* **1743**, 243–253.
- Michaud-Levesque, J., Demeule, M., and Beliveau, R. (2007a). *In vivo* inhibition of angiogenesis by a soluble form of melanotransferrin. *Carcinogenesis* **28**, 280–288.
- Michaud-Levesque, J., Demeule, M., and Béliveau, R. (2007b). Plasminogen-dependent internalization of soluble melanotransferrin involves the low-density lipoprotein receptor-related protein and annexin II. *Biol. Chem.* **388**, 747–754.
- Muto, Y., Suzuki, K., Sato, E., and Ishii, H. (2003). Carboxypeptidase B inhibitors reduce tissue factor-induced renal microthrombi in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **461**, 181–189.
- Pawse, A.R., and Tarachand, U. (1997). Clot lysis: role of plasminogen activator inhibitors in haemostasis and therapy. *Indian J. Exp. Biol.* **35**, 545–552.
- Perides, G., Zhuge, Y., Lin, T., Stins, M.F., Bronson, R.T., and Wu, J.K. (2006). The fibrinolytic system facilitates tumor cell migration across the blood-brain barrier in experimental melanoma brain metastasis. *BMC Cancer* **6**, 56.
- Posner, J.B. (1996). Brain metastases: 1995. A brief review. *J. Neurooncol.* **27**, 287–293.
- Risau, W., and Wolburg, H. (1990). Development of the blood-brain barrier. *Trends Neurosci.* **13**, 174–178.
- Rolland, Y., Demeule, M., and Beliveau, R. (2006). Melanotransferrin stimulates t-PA-dependent activation of plasminogen in endothelial cells leading to cell detachment. *Biochim. Biophys. Acta* **1763**, 393–401.
- Rolland, Y., Demeule, M., Michaud-Levesque, J., and Beliveau, R. (2007). Inhibition of tumor growth by a truncated and soluble form of melanotransferrin. *Exp. Cell Res.* **313**, 2910–2919.
- Romanic, A.M., and Madri, J.A. (1994). The induction of 72-kD gelatinase in T cells upon

- adhesion to endothelial cells is VCAM-1 dependent. *J. Cell Biol.* **125**, 1165–1178.
- Rothenberger, S., Food, M.R., Gabathuler, R., Kennard, M.L., Yamada, T., Yasuhara, O., Mcgeer, P.L., and Jefferies, W.A. (1996). Coincident expression and distribution of melanotransferrin and transferrin receptor in human brain capillary endothelium. *Brain Res.* **712**, 117–121.
- Sekyere, E.O., Dunn, L.L., and Richardson, D.R. (2005). Examination of the distribution of the transferrin homologue, melanotransferrin (tumour antigen p97), in mouse and human. *Biochim. Biophys. Acta* **1722**, 131–142.
- Skrzydłowska, E., Sulkowska, M., Koda, M., and Sulkowski, S. (2005). Proteolytic-antiproteolytic balance and its regulation in carcinogenesis. *World J. Gastroenterol.* **11**, 1251–1266.
- Smith, L.M., Nesterova, A., Alley, S.C., Torgov, M.Y., and Carter, P.J. (2006). Potent cytotoxicity of an auristatin-containing antibody-drug conjugate targeting melanoma cells expressing melanotransferrin/p97. *Mol. Cancer Ther.* **5**, 1474–1482.
- Stalboerger, P.G., Panetta, C.J., Simari, R.D., and Caplice, N.M. (2001). Plasmin proteolysis of endothelial cell and vessel wall associated tissue factor pathway inhibitor. *Thromb. Haemost.* **86**, 923–928.
- Stern, M., and Herrmann, R. (2005). Overview of monoclonal antibodies in cancer therapy: present and promise. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **54**, 11–29.
- Stewart, D.J. (1994). A critique of the role of the blood-brain barrier in the chemotherapy of human brain tumors. *J. Neurooncol.* **20**, 121–139.
- Waldmann, T.A. (2003). Immunotherapy: past, present and future. *Nat. Med.* **9**, 269–277.
- Wen, P.Y., and Loeffler, J.S. (2001) *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, 6th edn (Philadelphia, PA: Lippincott, W., & Wilkins, ed.).
- Yepes, M., Sandkvist, M., Moore, E.G., Bugge, T.H., Strickland, D.K., and Lawrence, D.A. (2003). Tissue-type plasminogen activator induces opening of the blood-brain barrier via the LDL receptor-related protein. *J. Clin. Invest.* **112**, 1533–1540.
- Zhang, Z., Zhang, L., Yepes, M., Jiang, Q., Li, Q., Arniego, P., Coleman, T.A., Lawrence, D.A., and Chopp, M. (2002). Adjuvant treatment with neuroserpin increases the therapeutic window for tissue-type plasminogen activator administration in a rat model of embolic stroke. *Circulation* **106**, 740–745.

**Table 1.** Pharmacokinetic parameters of [ $^{125}\text{I}$ ]-L235 mAb in plasma of female athymic nude mice

Dose (mg/kg)	C <sub>max</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	t <sub>max</sub> (hr)	t <sub>1/2</sub> (hr)	AUC <sub>(0-360)</sub> ( $\mu\text{g}\cdot\text{hr/mL}$ )	Vd (mL/kg)	CL (mL/hr/kg)
20	0.17 $\pm$ 0.01	24	115 $\pm$ 4	45.5 $\pm$ 1.1	73 $\pm$ 2	0.44 $\pm$ 0.01

Pharmacokinetic parameters were determined by inspection of the data using PK Solutions 2.0 software. Data are expressed as means  $\pm$  SD (n=3).

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1. MTf expression at the surface of CHO cells promotes cell invasion in vivo.** CHO Mock and MTf-transfected cells were labelled with [ $^3$ H]-thymidine over two days and injected into Crl:CD-1 mice tail veins. The amount of radiotracer in whole tissues was determined after 24 hours by liquid scintillation spectrometry as described in the Materials and methods section. In vivo invasion is expressed as number of cells per mg of tissue. Experiments were performed on eight different animals for both conditions. Means  $\pm$  SE are shown.

**Figure 2. Intravenous human melanoma cells produce brain metastasis in nude mice.** (A) SK-Mel 28 cells were injected intravenously in female athymic nude mice. Brain homogenates were analyzed for their content of human MTf-expressing cells by flow cytometric analysis using mAb L235 (black line) or IgG<sub>1</sub> control (grey area) and Alexa Fluor 488<sup>®</sup> conjugated antibodies, as described in the Materials and methods section. The specificity of the signal was also evaluated by the presence of recombinant truncated MTf (sMTf). All images are representative of five independent experiments. (B) The portion of mice brain cells expressing human membrane-bound MTf was quantified within the M1-gated cell population. Statistically significant differences compared to the mAb L235 signal from normal mice brain are marked as described. Experiments were performed on 3 normal mice and 5 melanoma injected mice. Data represent the means  $\pm$  SE.

**Figure 3. Monoclonal antibody L235 reduces the establishment of melanoma brain metastasis.** Female athymic nude mice received a single dose of 20 mg/kg mAb L235 or IgG<sub>1</sub> in saline solution by i.p. administration. Six hours later, SK-Mel 28 melanoma cells were injected into tail veins. After 24 weeks, mice brain were collected and their content of cells expressing human MTf was determined by flow cytometry as described in the Materials and methods section. (A) Brain homogenates from treated and untreated mice were incubated with mAb L235 (black line) or IgG<sub>1</sub> control isotype (grey area) and Alexa Fluor 488<sup>®</sup> conjugated antibodies. All images are representative of four different experiments (B) Portion of MTf-positive cells in brain homogenates was quantified within the M1-gated cell population. Statistically significant differences are shown for comparisons with the mAb L235 signal in normal mouse brain. Experiments were performed on 3 normal mice and 5 mice with melanoma brain metastasis (treated or not). Data represent the means  $\pm$  SE.

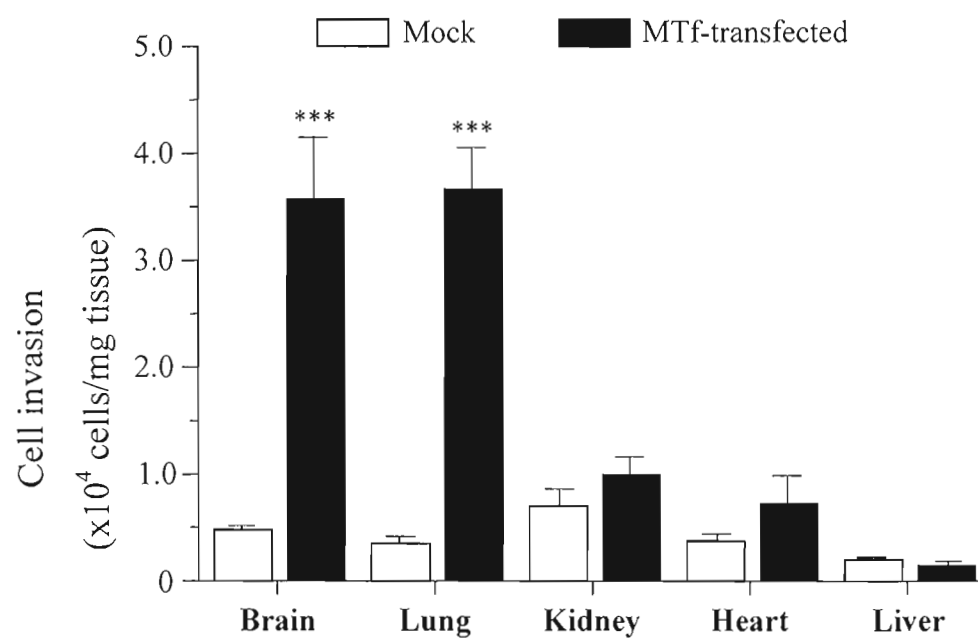
**Figure 4. Plasma concentration of mAb L235 in nude mice.** Female athymic nude mice received a single dose of 20mg/kg [ $^{125}$ I]-L235 in saline solution by intraperitoneal injection. At the allotted times, blood was collected and the quantity of the radiolabel was quantified using a gamma counter. Results are expressed as plasma concentration of mAb L235 ( $\mu$ M). The pharmacokinetic parameters derived from these data are summarized in Table 1. For each condition,  $n=3$  and the means  $\pm$  SE are shown.

**Figure 5. Membrane-bound melanotransferrin facilitates blood-brain barrier invasion *in vitro*.** (A) Protein expression of membrane-bound melanotransferrin (MTf) was studied by Western blot analysis in CHO cells transfected with the full-length human MTf cDNA (MTf-transfected) or with the control vector (Mock), as well as in SK-Mel 28, A2058 A101D and A375 human melanoma cells. The immunodetection of GAPDH was used as a loading control. (B) Cells were incubated with Hoechst 33342 and loaded onto the BBB *in vitro* model as described in the Materials and method sections. Fluorescent cells that migrated across the BCEC monolayer were visualized by fluorescent microscopy. Photos obtained from representative experiments are shown at an original magnification of 40x. (C) The transendothelial migration assay was quantified using Northern Eclipse software and expressed as the number of transmigrated cells per field. Data represent the means  $\pm$  standard error (SE) of results obtained from four different experiments performed in triplicate (10 random fields were considered for each filter).

**Figure 6. Monoclonal antibody L235 inhibits transmigration of MTf-expressing cells across the blood-brain barrier *in vitro*.** (A) Human melanoma cells and CHO cells (Mock and MTf-transfected) were incubated with an immunoglobulin control (IgG<sub>1</sub>) or with mAb L235 directed against MTf. Afterwards, cells were stained with Hoechst 33342 and loaded onto the BBB *in vitro* model as described in the Materials and method section. Representative photographs of transmigrated fluorescent cells are shown at the original magnification of 40x for all panels. Transendothelial migration of Mock and MTf-transfected CHO cells (B) as well as of SK-Mel 28 and A2058 human melanoma cells (C) was quantified using Northern Eclipse software in 10 different fields from four independent experiments performed in triplicate. Statistically significant differences are compared to IgG<sub>1</sub> control condition. Means  $\pm$  SE are shown.

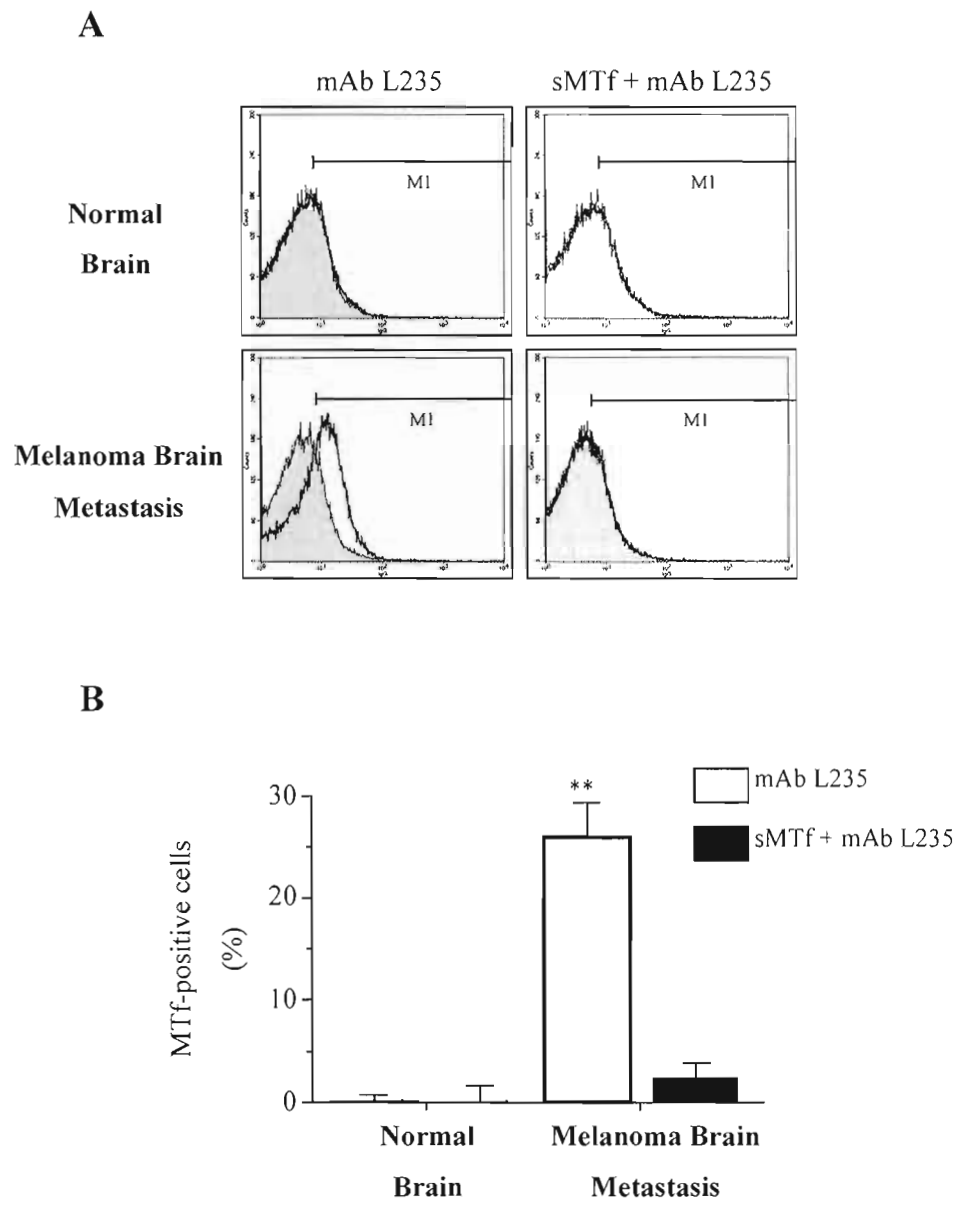
**Figure 7. Down-regulation of MTf expression in melanoma cells reduces cell transmigration ability.** SK-Mel 28 and A2058 melanoma cells were transfected with non-specific (control siRNA) or MTf-specific (MTf siRNA) siRNA during 48 hours. **(A)** Protein expression of MTf was studied in melanoma cells transfected or not with siRNAs by Western blot analysis. **(B)** MTf gene expression was quantified in melanoma cells by quantitative PCR and corrected by the measurement of the 18S ribosomal subunit reference gene, as described in the Materials and methods section. **(C)** Transmigration of fluorescent melanoma cells across the BBB *in vitro* model was quantified using Northern Eclipse software in 10 different fields from three independent experiments performed in triplicate. Statistically significant differences are compared to cells transfected with the control siRNA. Data represent the means  $\pm$  SE.

**Figure 8. Transmigration of MTf-expressing cells across the BBB *in vitro* involves the participation of plasminogen and MMP activation systems.** Transendothelial migration of melanoma SK-Mel 28 cells **(A)**, as well as of Mock and MTf-transfected CHO cells **(B)** across the BBB *in vitro* model was performed in presence of various protease inhibitors. The plasminogen activation system was studied through the addition of  $\alpha_2$ -antiplasmin ( $\alpha_2$ AP), epsilon aminocaproic acid (EACA) and a truncated, soluble form of MTf (sMTf). The involvement of MMPs was determined by using a broad range MMP inhibitor (GM6001) and mAbs directed against human MMP-2 and MMP-9. Transmigration was quantified from 10 different fields per conditions ( $n=6$ ) using Northern Eclipse software. Statistically significant differences are compared to the transmigration of CHO MTf-transfected cells in the absence of inhibitors. Data represent the means  $\pm$  SE.

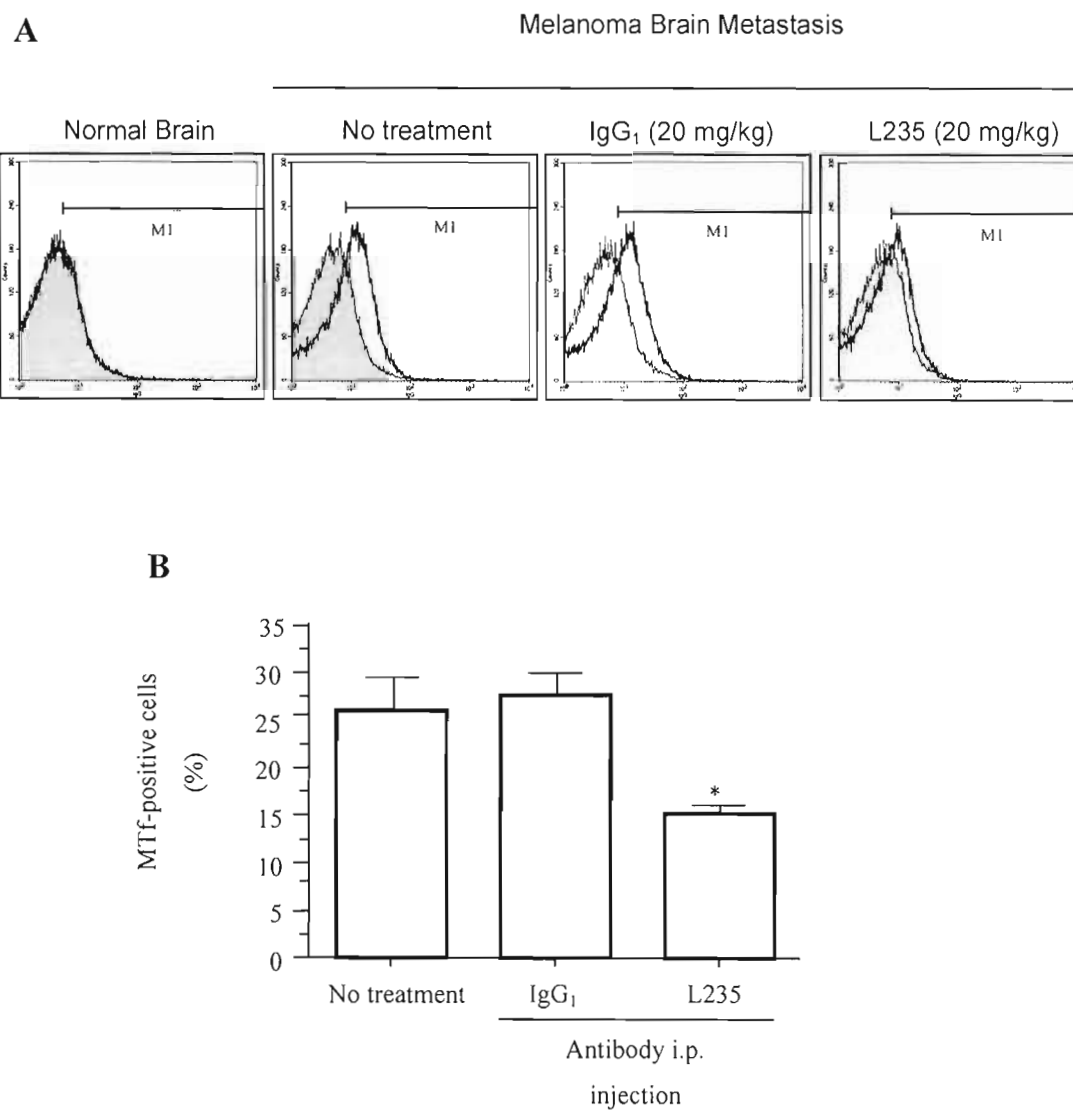


**Figure 1.** MTf expression at the surface of CHO cells promotes cell invasion *in vivo*.

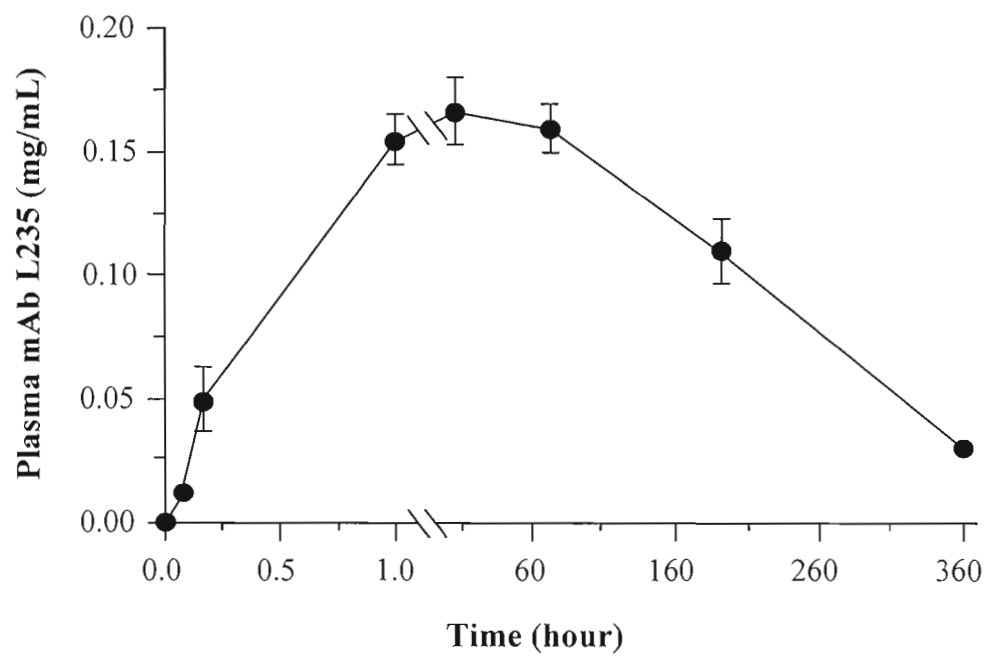




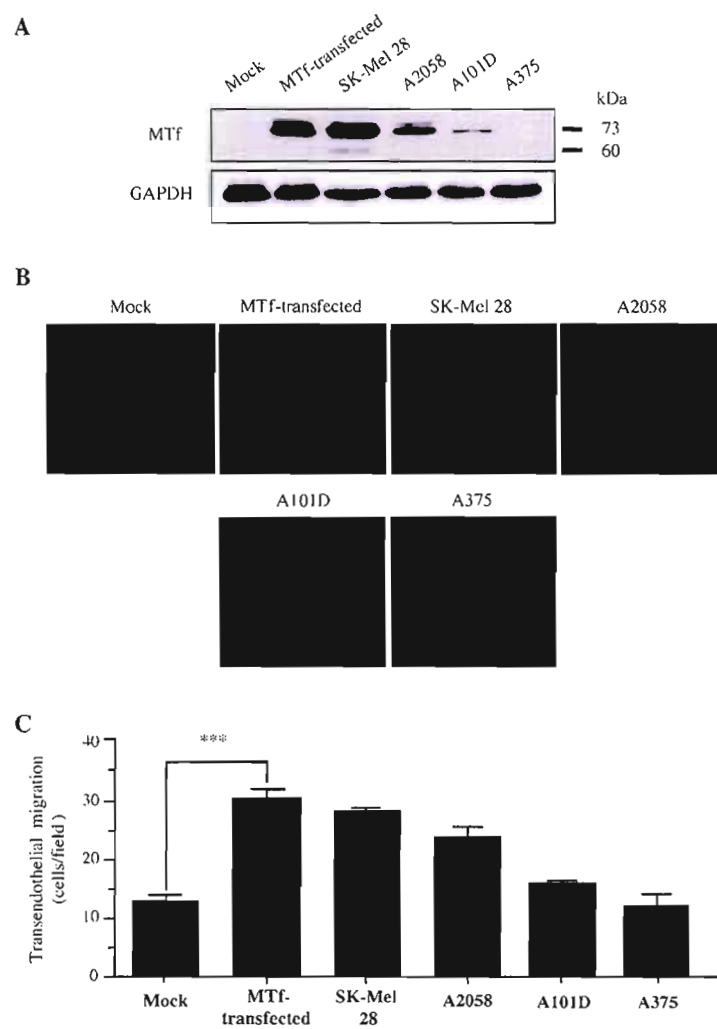
**Figure 2.** Intravenous human melanoma cells produce brain metastasis in nude mice.



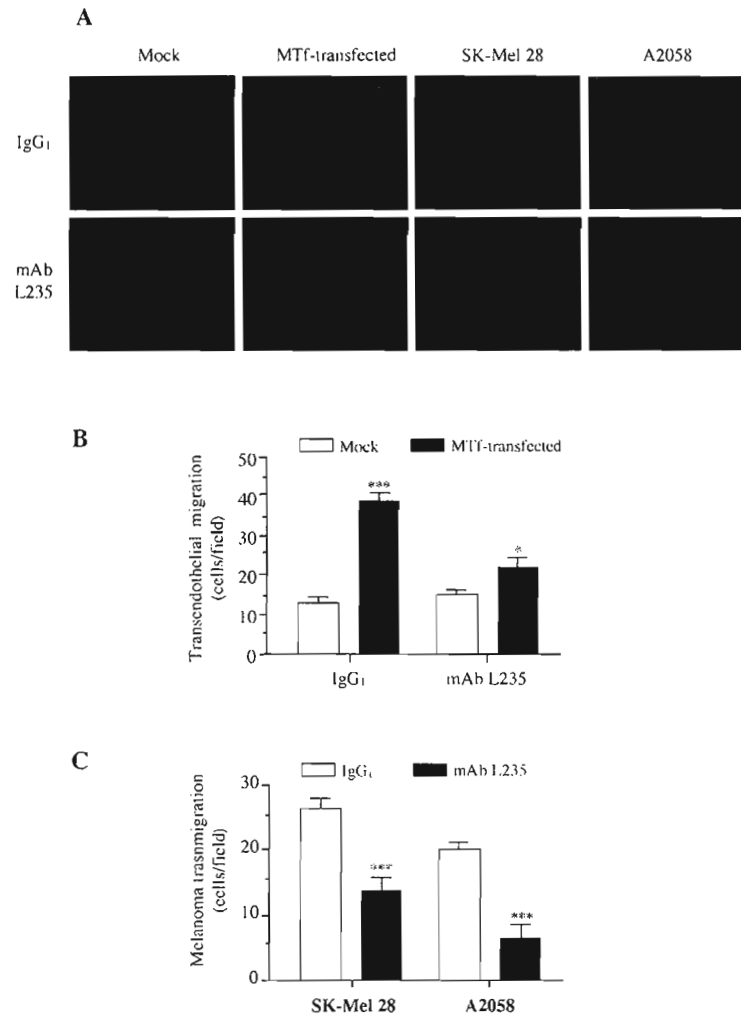
**Figure 3.** Monoclonal antibody L235 reduces the establishment of melanoma brain metastasis.



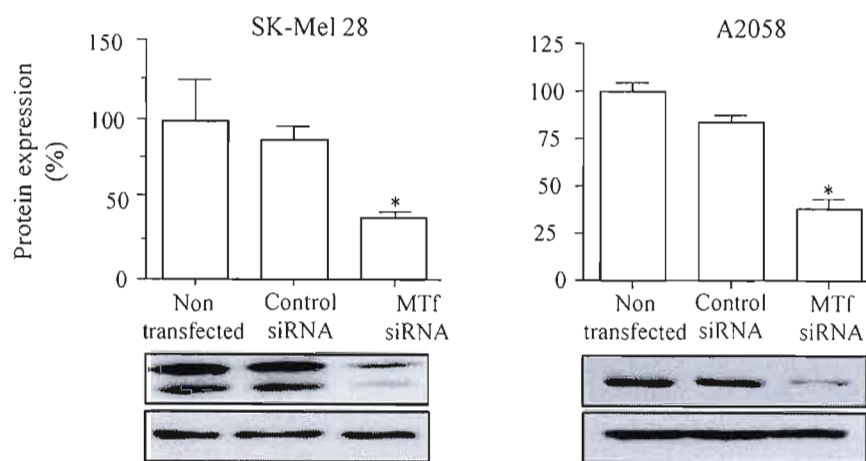
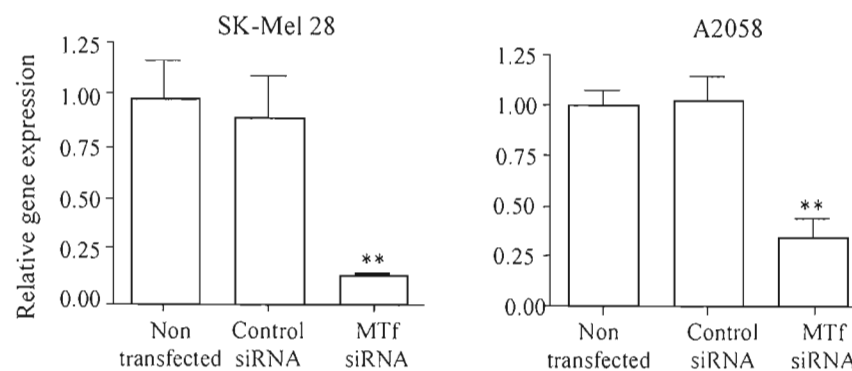
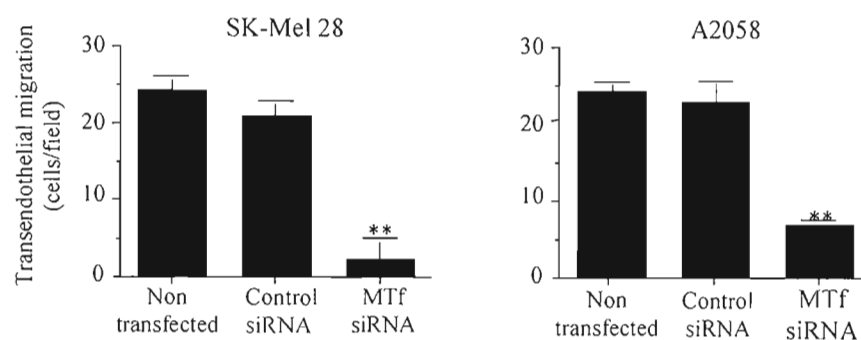
**Figure 4.** Plasma concentration of mAb L235 in nude mice.



**Figure 5.** Membrane-bound melanotransferrin facilitates blood-brain barrier invasion *in vitro*.

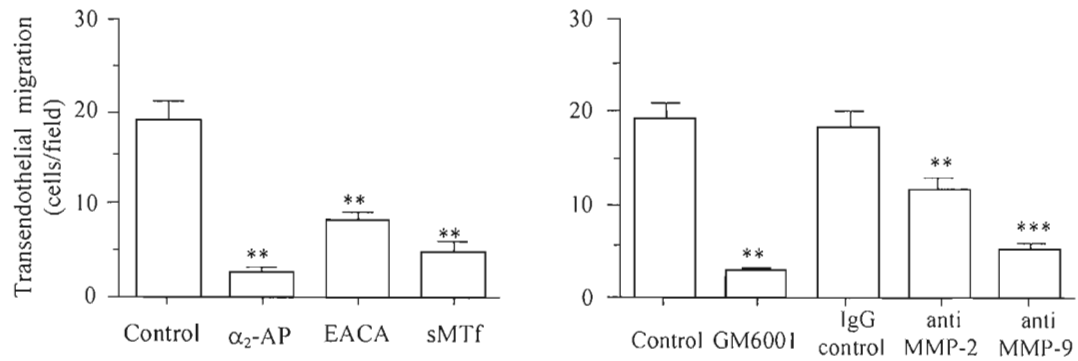


**Figure 6.** Monoclonal antibody L235 inhibits transmigration of MTf-expressing cells across the blood-brain barrier *in vitro*.

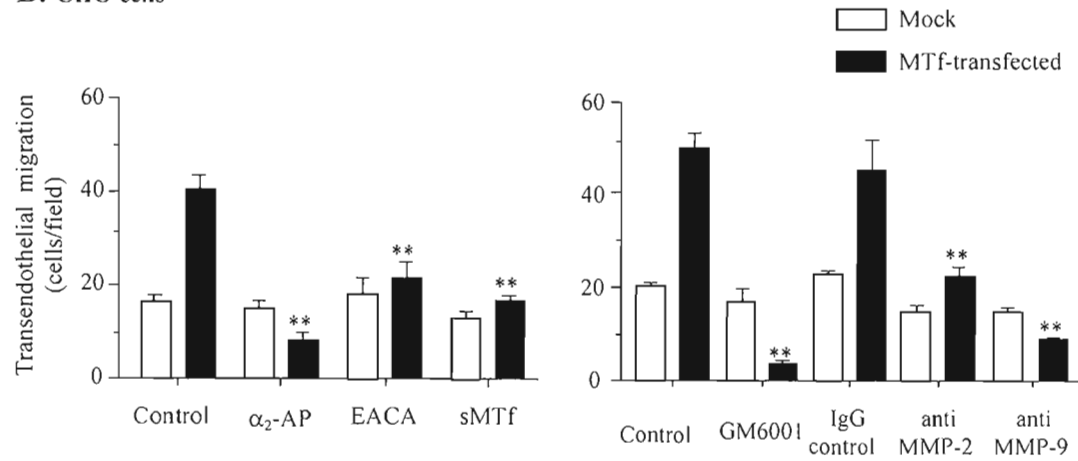
**A. Protein expression****B. Gene expression****C. Transmigration**

**Figure 7.** Down-regulation of MTf expression in melanoma cells reduces cell transmigration ability.

### A. Melanoma SK-Mel 28 cells



### B. CHO cells



**Figure 8.** Transmigration of MTF-expressing cells across the BBB *in vitro* involves the participation of plasminogen and MMP activation systems.

### CHAPITRE III

#### DISCUSSION

La progression tumorale nécessite la réalisation de plusieurs processus moléculaires. Parmi ceux-ci, le développement angiogénique est essentiel à la croissance tumorale en assurant un apport en nutriments et en oxygène (Folkman, 2003). L'acquisition du phénotype angiogénique par une tumeur stimule la migration des CE et leur différenciation en structure de type capillaire (Papetti et Herman, 2002; Lamalice, Le Boeuf et Huot, 2007). La sécrétion et l'activation de divers facteurs entraîne ce remodelage vasculaire et permet la prolifération des cellules cancéreuses. À cet effet, le rôle du système d'activation du plasminogène dans le développement de l'angiogenèse est bien établi. La conversion du plasminogène en plasmine favorise la croissance tumorale en favorisant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins et l'invasion des cellules tumorales. Par sa liaison au plasminogène, la mMTf accroît la formation de plasmine dans le milieu péricellulaire. La présente recherche vise à évaluer le rôle de la MTf dans la formation de plasmine, de même que dans la croissance tumorale et la dissémination métastatique. Les principaux résultats de cette thèse mettent en lumière les potentiels thérapeutiques de la sMTf recombinante et du L235, un anticorps monoclonal dirigé contre la MTf, afin de contrer la progression tumorale.



### 3.1 La sMTf recombinante induit le détachement des cellules endothéliales en stimulant l'activation du plasminogène par le tPA.

Récemment, des études d'interactions biospécifiques ont permis de démontrer que la sMTf recombinante pouvait interagir directement avec le pro-uPA et le plasminogène. En s'associant avec le plasminogène, la sMTf recombinante abaisse le  $K_m$  du pro-uPA pour le zymogène et accroît la vitesse maximale de la réaction (Demeule *et al.*, 2003). Bien que ces études n'aient montré aucune interaction spécifique entre le tPA et la sMTf recombinante, nos résultats montrent clairement que la sMTf recombinante augmente la formation de plasmine dans le milieu extracellulaire de CE en présence de tPA. Cette conversion accrue est également associée à une activité protéolytique dans le milieu de culture. La sMTf recombinante pourrait protéger la plasmine de son autoprotéolyse en s'associant à ses domaines *kringles* et retarder son internalisation. Cette hypothèse pourrait expliquer la formation excessive de plasmine à partir de quantités constantes de plasminogène initial. Plusieurs études montrent que le processus protéolytique joue un rôle majeur dans la régulation de l'angiogenèse. Parmi les inhibiteurs endogènes de l'angiogenèse, la plupart sont des fragments issus de protéolyse (Cao, 1999). Il a été démontré que l'angiostatine, un fragment du plasminogène, inhibe la croissance de tumeur humaine et la formation de métastase en ciblant spécifiquement les CE (O'Reilly *et al.*, 1994; Sharma et Sharma, 2007). Une étude rapporte également que la digestion de la fibronectine par la plasmine génère un fragment bloquant la prolifération des CE (Holmgren, O'Reilly et Folkman, 1995). En tout état de cause, de plus amples études sont nécessaires afin de clarifier les événements moléculaires entre la sMTf recombinante et les membres du système d'activation du plasminogène.

L'accroissement de plasmine générée par le biais de la sMTf recombinante a certainement un impact majeur sur la réorganisation de la matrice environnante. En effet, nous démontrons que la quantité de fibronectine associée aux cellules endothéliales est réduite au profit de celle présente dans le milieu extracellulaire. La fibronectine est connue pour réguler la signalisation assurant la survie des cellules adhérentes (Sechler et

Schwarzbauer, 1998). De plus, cette protéine de la MEC joue un rôle important dans plusieurs processus cellulaires, dont la migration, la différenciation et la prolifération (Guan et Hynes, 1990). Une étude a rapporté que des niveaux élevés de plasmine pouvaient induire une réduction significative de la fibronectine au niveau des CE, ainsi qu'une augmentation concomitante de fragments de fibronectine dans le milieu extracellulaire (Bonnefoy et Legrand, 2000). La réduction de fibronectine associée aux cellules HMEC-1 traitées avec une combinaison de sMTf recombinante, de tPA et de plasminogène, pourrait ainsi résulter d'un clivage de la protéine intacte par la plasmine. La fibronectine s'associe à la surface cellulaire par divers récepteurs, dont l'intégrine  $\alpha_5\beta_1$ , par son domaine appelé RGD (Arg-Gly-Asp). D'ailleurs, l'importance de ce domaine dans l'adhésion et la survie cellulaire est bien établi (Buckley *et al.*, 1999; Hadden et Henke, 2000). Nos résultats suggèrent fortement que la perte de l'association de ces interactions fibronectine-intégrines conduit au détachement des CE et à leur mort par anoïkis. La modulation de la matrice de fibronectine est un élément fondamental dans la régulation de l'apoptose induite par le détachement cellulaire (Hadden et Henke, 2000; Jeong *et al.*, 2001; Verderio *et al.*, 2003). Des résultats similaires ont été obtenus avec l'endostatine amyloïde, un co-facteur dans l'activation du plasminogène médiée par le tPA. Dans cette recherche, la plasmine formée induit la conversion du plasminogène au niveau des CE, dégrade la vitronectine et conduit à leur détachement (Reijerkerk, Voest et Gebbink, 2000; Reijerkerk *et al.*, 2003). Par conséquent, nos résultats suggèrent que la sMTf recombinante agit de manière similaire sur la matrice de fibronectine.

Le tPA est majoritairement associé au système fibrinolytique du fait qu'il possède une forte affinité envers la fibrine (Collen, 1999). Toutefois, il participerait également à la dégradation de la MEC lors du développement angiogénique (Sato *et al.*, 1993). Des études rapportent que le tPA peut être sécrété par plusieurs cellules néoplasiques, dont les cellules provenant de mélanomes (Rijken et Collen, 1981), de neuroblastomes (Neuman *et al.*, 1989), et des cancers ovariens (Amin, Karlan et Littlefield, 1987), mammaires et pancréatiques (Paciucci *et al.*, 1998). De plus, des niveaux élevés de tPA ont été détectés au sein de diverses tumeurs humaines (Yamashita *et al.*, 1992; Gris *et al.*, 1993; Hackel *et al.*, 1997; Lindgren *et al.*, 1997; De Petro *et al.*, 1998). Ce faisant, l'ajout de tPA à une culture de CE, comme dans

la présente étude, peut refléter une stimulation pro-angiogénique. Le développement angiogénique induit la sécrétion de tPA et de facteurs de croissance afin de stimuler la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir des CE environnantes. La migration des CE requiert la liaison des molécules d'adhérence (intégrines et sélectines) à leurs substrats présents dans la MEC (Conway, Collen et Carmeliet, 2001). Or, les résultats présentés démontrent que l'ajout de sMTf recombinante entraîne le détachement des CE par le clivage des molécules de fibronectine. Ainsi, la sMTf recombinante interférerait avec la stimulation angiogénique en induisant l'anoïkis des CE.

Les effets de deux inhibiteurs de MMP sur le détachement des cellules HMEC-1 nous permettent de confirmer la participation de ces protéases dans le processus observé. Autant l'inhibiteur à large spectre, le GM6001 ou ilomastat, que l'EGCG, une catéchine du thé vert, parviennent à empêcher le détachement des CE et ce, de manière indépendante de la formation de plasmine dans le milieu extracellulaire. Bien que la plasmine ait la capacité d'activer les pro-MMP, ses niveaux sont fréquemment insuffisants pour y arriver (Reijerkerk *et al.*, 2003). Nos résultats suggèrent que l'aptitude de la sMTf recombinante à stimuler l'activation du plasminogène par le tPA, conduirait à des niveaux de plasmine assez importants pour générer une activité métalloprotéasique. Compte tenu que les MMP jouent un rôle important dans le détachement des CE induit par la sMTf recombinante, nous avons tenté d'identifier la participation d'une protéase en particulier. Nos résultats montrent que le traitement des cellules HMEC-1 avec un anticorps monoclonal dirigé contre la MMP-2 prévient le détachement cellulaire. Ainsi, l'activité protéolytique de la MMP-2 contribue à la digestion locale de la MEC et éventuellement à la protéolyse de la matrice de fibronectine. Par conséquent, la présence de sMTf recombinante dans le milieu de culture conduit à une activation plus efficace du plasminogène et stimule l'activation de la pro-MMP2.

L'anoïkis est un processus physiologique participant à l'homéostasie cellulaire et tissulaire lors du développement, du renouvellement et de la régression (Werb *et al.*, 1996). Toutefois, la mort programmée des cellules adhérentes est aussi impliquée dans certaines pathologies. La résistance à ce mécanisme est notamment bien connu dans les cancers.

L'augmentation de l'anoïkis combinée à l'absence du renouvellement cellulaire mène à l'apparition de diverses pathologies cardiovasculaires dégénératives et à la fibrosclérose (Kockx et Herman, 2000; Walsh, Smith et Kim, 2000). La compétition des interactions cellules-matrices par les peptides synthétiques RGD (arginine-glycine-aspartate) est une méthode fréquemment employée pour induire l'anoïkis des cellules adhérentes en culture. Plusieurs études ont observé une diminution de l'adhésion et de la prolifération des cellules endothéliales, musculaires lisses et de fibroblastes par des peptides RGD (Choi *et al.*, 1994; Re *et al.*, 1994; Bilato *et al.*, 1997; McGill *et al.*, 1997). Puisque la MTf possède une séquence RGD, son action pourrait résider dans la compétition à la liaison aux intégrines. Par ailleurs, la fibronectine possède un motif RGD qui est libéré sous forme de peptide lorsque la fibronectine est digérée par la plasmine (Fukai *et al.*, 1998). Par conséquent, la présente étude suggère que la sMTf recombinante peut compétitionner directement avec la liaison des intégrines à la MEC. Nous démontrons aussi que la sMTf recombinante induit une production excessive de plasmine, qui à son tour digère les protéines de la matrice et génère le relargage de peptides actifs favorisant l'apoptose des CE.

La protéolyse impliquée dans la destruction et le remodelage de la matrice requiert un étroit contrôle spatial et temporel. En effet, une protéolyse excessive peut causer des dommages importants aux tissus et dégrader la matrice essentielle à l'ancrage des cellules migratoires (Bajou *et al.*, 2001). En l'absence d'une matrice, l'adhésion des CE et leur réponse aux stimuli angiogéniques sont compromis (Reijerkerk, Voest et Gebbink, 2000). Les résultats de cette étude démontrent qu'en conditions pro-angiogéniques, la stimulation abusive du système d'activation du plasminogène par la sMTf résulte en une protéolyse excessive de la MEC et au détachement des CE. De plus, la sMTf recombinante propose une manière novatrice d'interférer avec la croissance tumorale.

### **3.2 La sMTf inhibe l'angiogenèse et la croissance tumorale.**

La croissance tumorale dépend de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, sans

quoi, les cellules tumorales deviennent nécrotiques ou apoptotiques (Parangi *et al.*, 1996). L'angiogenèse est un processus capital dans la progression tumorale impliquant la prolifération et la migration des CE, de même que leur différenciation en structures de type capillaire (Papetti et Herman, 2002; Carmeliet, 2005). Dans cette étude, nous confirmons que la sMTf recombinante régule la migration des CE et interfère avec la vascularisation d'implants de Matrigel induite par les facteurs de croissance. Il a été démontré que plusieurs cytokines angiogéniques étaient exprimées par les cellules tumorales, incluant le bFGF, le VEGF et l'interleukine-8 (Bohle et Kalthoff, 1999). Les cellules tumorales provenant de glioblastomes particulièrement agressifs expriment de hauts niveaux de VEGF lorsqu'elles bordent les micro-vaisseaux, suggérant ainsi que les cellules endothéliales et tumorales interagissent étroitement (Bian *et al.*, 2006). Le recrutement des CE par les cellules tumorales assurent leur migration et leur prolifération afin de promouvoir la formation d'un nouveau réseau sanguin. Nos résultats ont déjà démontré que la sMTf recombinante modulait plusieurs étapes essentielles au développement angiogénique *in vitro* et *in vivo* (Michaud-Levesque, Demeule et Beliveau, 2005; Michaud-Levesque *et al.*, 2005; Michaud-Levesque, Demeule et Beliveau, 2007). Par conséquent, nous avons tenu à évaluer la capacité de la sMTf recombinante à interférer avec la progression tumorale *in vivo*.

Dans la présente étude, nous montrons que l'administration constante de sMTf recombinante dans les souris immunodéficientes à l'aide de micropompes osmotiques entraîne une réduction du contenu en hémoglobine au sein de tumeurs sous-cutanées dérivées de glioblastome multiforme (cellules U-87 MG). Cette diminution de l'angiogenèse est également associée à l'inhibition de la croissance des tumeurs de glioblastomes. En fait, l'évaluation de l'angiogenèse tumorale, telle que déterminée par le contenu en hémoglobine, révèle que les tumeurs dérivées de glioblastomes multiformes sont hautement vascularisées. L'analyse de la densité vasculaire dans les tumeurs astrocytaires a déjà conduit à des conclusions contradictoires quant à sa valeur pronostic (Leon, Folkerth et Black, 1996; Yao *et al.*, 2001). Bien que la détection de marqueurs endothéliaux à l'aide d'anticorps anti-CD31, anti-CD34 et anti-facteur-VIII, soit fréquemment utilisée pour l'évaluation du développement angiogénique, ces anticorps réagissent de manière équivalente avec les vaisseaux néoformés et les vaisseaux pré-existants inclus dans la tumeur. L'endogline, ou CD105, est une protéine

essentielle à l'angiogenèse qui est exprimée à la surface des CE (Li *et al.*, 2000). Il a été rapporté que les anticorps anti-CD105 réagissaient préférentiellement avec les CE activées des tissus angiogéniques, comparativement aux CE provenant des tissus sains (Wang *et al.*, 1994; Kumar, Wang et Bernabeu, 1996). Bien que l'équipe de Gomez-Esquer ait montré que l'ARNm d'endogline n'était pas corrélé avec l'agressivité des tumeurs mammaires (Gomez *et al.*, 1997), plusieurs études identifient CD105 comme un marqueur privilégié dans l'évaluation de l'angiogenèse pour divers types de cancer, dont les glioblastomes (Behrem *et al.*, 2005; Yao *et al.*, 2005). Globalement, nos résultats indiquent que la sMTf recombinante possède des propriétés anti-angiogéniques puisqu'elle affecte la croissance de glioblastomes sous-cutanés en perturbant le développement de l'angiogenèse au sein des tumeurs. Le fait que la sMTf recombinante module l'angiogenèse est prometteur pour contrer la croissance des tumeurs primaires en soi, mais également au niveau du processus global de la progression tumorale. La formation de nouveaux vaisseaux sanguins tumoraux représente un facteur de risque pour le développement de métastases de deux manières : d'une part en favorisant le contact entre les cellules tumorales et leur voies de dissémination; d'autre part, les vaisseaux sanguins tumoraux présentent une morphologie différente des vaisseaux normaux, c'est-à-dire un diamètre supérieur et une perméabilité accrue en raison de la fragmentation de la membrane basale (Carmeliet et Jain, 2000). Ainsi, les cellules tumorales ont plus de facilité à y pénétrer (Kopfstein et Christofori, 2006). Il y a lieu de croire que la sMTf recombinante puisse moduler la dissémination métastatique en régulant le processus angiogénique tumoral.

Parralèlement, le traitement de souris à la sMTf recombinante conduit à une inhibition considérable, et parfois à une régression, de la croissance de tumeurs dérivées de carcinome pulmonaire (cellules NCI-H460). Dans ce modèle, la sMTf recombinante agirait comme agent anti-cancéreux. Effectivement, contrairement aux cellules U-87 MG, les cellules NCI-H460 voient leurs propres capacités invasives réduites par la sMTf recombinante. En se basant sur les résultats antérieurs, la sMTf recombinante compétitionnerait avec la liaison du plasminogène à la MTf membranaire et réduirait la formation de plasmine à la surface cellulaire. Nous démontrons que les cellules NCI-H460 expriment la MTf membranaire, comparativement aux cellules de glioblastomes utilisées. Par conséquent, l'action de la sMTf recombinante cible également les cellules tumorales selon

leur niveau d'expression de MTf membranaire. Une rupture dans l'équilibre du système d'activation du plasminogène, tel qu'il apparaît dans la pathologie du cancer, pourrait entraîner les cellules cancéreuses à envahir les tissus environnants et éventuellement à métastasier aux régions distantes de la tumeur primaire (Andreasen *et al.*, 1997). En plus de réduire la liaison du plasminogène à la MTf membranaire, la sMTf recombinante régule de manière négative l'expression de l'uPAR au niveau des CE. Une étude précédente démontre que la sMTf recombinante affecte le recyclage de l'uPAR libre et actif à la surface des CE en augmentant l'internalisation du récepteur LRP de même qu'en réduisant son expression protéique (Michaud-Levesque *et al.*, 2005). Nos résultats suggèrent que la sMTf recombinante provoquerait des effets similaires pour divers types cellulaires exprimant la MTf membranaire, dont les cellules NCI-H460. Par ailleurs, la régulation de l'activité de ces récepteurs par la sMTf recombinante contribuerait grandement à l'inhibition de la migration cellulaire. En effet, la modulation de l'expression de uPAR/LRP par la sMTf recombinante s'avère un événement important dans l'invasion et la migration cellulaire *in vitro*. LRP a un rôle protecteur dans le maintien de la structure vasculaire et sa déficience ou surexpression peut causer des désordres vasculaires (Llorente-Cortes et Badimon, 2005). Bien que de plus amples études soient nécessaires afin d'évaluer les effets de la sMTf recombinante sur les tissus sains, aucune anomalie n'a été observée chez les souris traitées. La sMTf recombinante apparaît comme un régulateur important de la formation de plasmine en intervenant à différents niveaux. De même, nous montrons clairement que la sMTf recombinante affecte la croissance des cellules tumorales NCI-H460 en ciblant le système uPAR/LRP ainsi que la formation de plasmine péricellulaire.

Comme nos résultats le démontrent, l'inhibition de la croissance tumorale par la sMTf recombinante résulte de différents événements moléculaires. En fait, cette protéine semble cibler les cellules exprimant la MTf à leur surface. Advenant le cas où la tumeur présente des niveaux élevés de MTf, comme les tumeurs de carcinome pulmonaire, la sMTf recombinante agit de manière anti-cancéreuse. Dans le cas contraire, c'est-à-dire lorsque la MTf membranaire n'est pas exprimée au sein d'une tumeur comme pour les tumeurs de glioblastomes, la sMTf recombinante aurait des propriétés anti-angiogéniques en ciblant les CE environnantes qui expriment la MTf. La MTf a d'ailleurs déjà été détectée au niveau de

l'endothélium des capillaires (Rothenberger *et al.*, 1996). Ainsi, cette étude suggère que l'équilibre entre les MTf membranaire et soluble est capital. Compte tenu que la concentration moyenne de la sMTf circulante endogène atteint 33 pM dans le plasma (Kim *et al.*, 2001), l'ajout de sMTf recombinante perturbe l'équilibre avec la mMTf. Nous avons déjà rapporté que la liaison du plasminogène à la mMTf favorisait sa conversion en plasmine et augmentait le potentiel migratoire *in vitro* (Michaud-Levesque, Demeule et Beliveau, 2005; Bertrand *et al.*, 2007). Le rôle de la mMTf dans l'invasion cellulaire est d'autant plus mis en évidence par la présence significative de cellules exprimant la MTf (cellules CHO) dans le cerveau, les poumons et les reins de souris ayant reçu une injection intraveineuse de cellules. La participation de la MTf dans la migration et la prolifération cellulaire a été rapportée par Dunn *et al.*, où la régulation post transcriptionnelle de l'expression de la MTf dans les cellules de mélanomes SK-Mel 28 suspend leur prolifération et inhibe la croissance tumorale (Dunn *et al.*, 2006). Notre équipe a également récemment démontré que l'expression de la MTf dans les cellules SK-Mel 28 réduisait leur potentiel invasif chez la souris (Bertrand *et al.*, 2007). Par conséquent, les travaux effectués sur la MTf permettent d'établir que cette protéine joue un rôle clé dans la progression tumorale.

La présente étude montre manifestement les propriétés dichotomiques de la MTf. La forme membranaire stimule la motilité cellulaire en favorisant la formation de plasmine péricellulaire. À cet effet, la mMTf s'avère une cible thérapeutique intéressante puisqu'elle soutient la progression tumorale. De plus, la mMTf pourrait être considérée comme un biomarqueur potentiel de l'agressivité des tumeurs. À l'opposé, la sMTf recombinante réduit la migration et l'invasion des cellules en affectant l'expression des récepteurs du système uPAR/LRP. La sMTf recombinante apparaît ainsi comme une nouvelle approche pour le traitement du cancer, en ciblant autant l'endothélium tumoral que les cellules cancéreuses exprimant la mMTf. Ces propriétés particulières distinguent la sMTf recombinante des traitements anti-cancéreux et/ou anti-angiogéniques conventionnels à cible unique.



### 3.3 L'expression de la MTf à la surface des mélanomes favorise le développement de métastases cérébrales.

Les métastases cérébrales représentent la forme de tumeur intracrânienne la plus répandue, comptant pour plus de la moitié des tumeurs cérébrales chez les adultes (Wen et Loeffler, 2001). Le cerveau est un organe fréquemment ciblé par les mélanomes malins lors de la dissémination métastatique (Posner, 1996). Parmi les antigènes majeurs des mélanomes malins, un intérêt croissant se manifeste envers la MTf. Comparativement aux cellules possédant de très faibles niveaux de mMTf, nous démontrons que les cellules surexprimant la MTf à leur surface ont une meilleure aptitude à traverser l'endothélium d'un modèle *in vitro* de la BHE. Des études antérieures rapportent que les cellules de mélanomes humains SK-Mel 28 possèdent de  $3 \text{ à } 3,8 \times 10^5$  sites de MTf par cellule (Brown *et al.*, 1981b), tandis que les cellules CHO transfectées avec la séquence complète codant pour la MTf humaine en dénombreraient  $1,2 \times 10^6$  par cellule (Kennard *et al.*, 1995). En fait, ces deux lignées cellulaires partagent non seulement la surexpression de la MTf à leur surface, mais également un important potentiel invasif (Demeule *et al.*, 2003; Michaud-Levesque, Demeule et Beliveau, 2005). Les résultats obtenus par régulation post-transcriptionnelle de la MTf par siRNA indiquent une corrélation évidente entre les niveaux d'expression de cette protéine et la capacité des mélanomes à migrer à travers la BHE *in vitro*. Nous démontrons d'emblée que les aptitudes invasives associées à la MTf sont également valables dans des modèles murins. En effet, l'invasion accrue des poumons et cerveaux de souris par les cellules CHO exprimant la MTf indique que l'expression de la MTf favoriserait également l'invasion cellulaire *in vivo*. Par ailleurs, l'identification de l'antigène humain MTf dans le cerveau de souris ayant reçu une injection de cellules SK-Mel 28 démontre la formation de métastases cérébrales à long terme. Après avoir atteint le système vasculaire, les cellules tumorales doivent accomplir une série d'étapes afin d'envahir avec succès différents tissus à distance. Les données présentées révèlent que certaines cellules de mélanomes ont adhéré à l'endothélium vasculaire des capillaires cérébraux et atteint le système nerveux central. Ces résultats sont les premiers à montrer l'implication de la mMTf dans l'invasion des cellules de mélanomes menant au développement de métastases cérébrales. Il a déjà été suggéré que la MTf pouvait stimuler la prolifération cellulaire. À cet effet, l'équipe de Jefferies rapporte que l'expression de la MTf

dans les cellules de CHO ne modifie pas leur taux de prolifération cellulaire (Kennard *et al.*, 1995). Cependant, des études *in vivo* récentes montrent que les cellules de mélanomes dont l'expression de la MTF a été régulée à la baisse présentent une réduction de l'initiation et de la croissance tumorale dans les souris immunodéficientes (Dunn *et al.*, 2006). Ainsi, des niveaux élevés de MTF à la surface des mélanomes favoriseraient d'une part leur migration à travers l'endothélium de la BHE, et d'autre part stimuleraient leur prolifération après avoir atteint le SNC.

L'inhibition de la migration transendothéliale des cellules exprimant la mMTf par divers inhibiteurs du système d'activation du plasminogène suggère que la plasmine constitue un joueur clé dans ce processus. En tant que récepteur potentiel du plasminogène, la MTF membranaire stimule la conversion du plasminogène en plasmine par ses activateurs associés à la membrane plasmique et accroît le potentiel invasif des cellules (Michaud-Levesque, Demeule et Beliveau, 2005). L'implication du système fibrinolytique lors de la migration des mélanomes à travers un modèle *in vitro* de la BHE a récemment été démontrée (Perides *et al.*, 2006). Des interactions importantes entre les membres du système d'activation du plasminogène et la MTF ont déjà été établies (Demeule *et al.*, 2003; Michaud-Levesque, Demeule et Beliveau, 2005). En fait, la MTF a la capacité de stimuler l'activation du plasminogène tant par le tPA (Rolland, Demeule et Beliveau, 2006) que par l'uPA (Demeule *et al.*, 2003). Compte tenu que l'activation du plasminogène constitue un élément déclencheur de la dégradation matricielle dans l'invasion cellulaire, la stimulation de la formation de plasmine par la MTF à la surface cellulaire des mélanomes facilite certainement leur extravasation au cerveau. Ces résultats amènent la possibilité intéressante de réguler le développement métastatique en ciblant la MTF au niveau des cellules tumorales.

Le système d'activation du plasminogène joue un rôle clé non seulement dans la dissolution de caillots sanguins (Pawse et Tarachand, 1997), mais aussi dans une variété de processus physiologiques et pathologiques, incluant l'inflammation (Del Rosso *et al.*, 2008), le remodelage tissulaire et le développement de métastases (Andreasen, Egelund et Petersen, 2000). La plasmine est connue pour être notamment impliquée dans la protéolyse

extracellulaire de la paroi des vaisseaux sanguins (Stalboerger *et al.*, 2001). Nos résultats montrent une perméabilité accrue de la BHE pour le sucrose après 12 heures de migration transendothéliale des cellules SK-Mel 28, suggérant ainsi que la plasmine générée à la surface des cellules de mélanomes affecte l'intégrité de la BHE par la dégradation locale de la monocouche de BCEC. Une étude portant sur l'intégrité de la BHE autour de petites lésions, telles que les métastases ou micro-tumeurs, montre que la barrière recouvre son imperméabilité et son intégrité après le passage des cellules métastatiques dans le parenchyme (Fidler *et al.*, 1999). Par conséquent, la migration des cellules SK-Mel 28 vers le SNC semble s'effectuer par une ouverture temporaire et localisée de la BHE grâce à la stimulation de la production de plasmine par la mMTf.

Les résultats présentés dans cette étude montrent que la sMTf recombinante réduit de manière significative la migration transendothéliale des cellules exprimant la mMTf à travers la BHE *in vitro*. Nous avons déjà démontré que la sMTf recombinante inhibait la liaison du plasminogène à la surface cellulaire en interagissant avec le zymogène dans le milieu environnant et réduisant ainsi la quantité disponible à proximité de la membrane plasmique (Michaud-Levesque, Demeule et Beliveau, 2005). De manière plus précise, suite à la liaison de la sMTf recombinante au plasminogène, le complexe s'associe à l'annexine II et son internalisation est médiée par LRP (Michaud-Levesque, Demeule et Béliveau, 2007). Or, nous avons rapporté que la sMTf recombinante réduisait les niveaux protéiques de LRP au sein des CE (Michaud-Levesque *et al.*, 2005). L'ouverture de la BHE médiée par le tPA impliquerait la participation de LRP, un récepteur bien connu pour son rôle dans la signalisation entre le SNC et l'endothélium vasculaire (Bu *et al.*, 1992; Hahn-Dantona *et al.*, 2001; Herz et Bock, 2002; Boucher *et al.*, 2003). La régulation de la perméabilité cérébrovasculaire est fondamentale au maintien de l'héméostasie cérébrale et l'ouverture de la BHE est associée à la formation d'œdème intracrânien dans plusieurs pathologies neurologiques (Schilling et Wahl, 1997). Plusieurs études montrent que le tPA et la MMP-9 sont en partie responsables de la rupture de la BHE (Romanic et Madri, 1994; Aoki *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2002). Par conséquent, la sMTf recombinante pourrait moduler la migration transendothéliale des cellules de mélanomes à différents niveaux; le premier en

régulant la conversion du plasminogène par la mMTf et le second en mobilisant LRP pour l'internalisation du plasminogène.

De manière intéressante, l'injection de L235, un anticorps dirigé contre la MTf humaine réduit de manière significative l'invasion cérébrale de mélanomes circulants chez la souris immunodéficiente. Nous démontrons que l'administration d'une dose de 20 mg/kg de L235 génère une concentration plasmatique suffisante pour inhiber la migration transendothéliale des cellules de mélanomes *in vitro*. Nous avons déjà rapporté que le L235 inhibait la liaison et l'activation subséquente du plasminogène à la surface cellulaire de cellules exprimant la MTf (Michaud-Levesque, Demeule et Beliveau, 2005). Or, la liaison du L235 à la mMTf interfère certainement avec l'habileté des cellules SK-Mel 28 à stimuler la formation de plasmine péricellulaire, réduisant ainsi leur capacité à digérer la matrice de l'endothélium vasculaire lors de l'extravasation au cerveau. La chimiothérapie a un rôle limité dans le traitement des métastases cérébrales et les recherches futures misent sur la prévention des métastases du SNC en ciblant les cellules cancéreuses circulantes à l'aide de thérapies basées sur les anticorps monoclonaux (Waldmann, 2003; Stern et Herrmann, 2005). L'expression de la MTf à la surface des cellules de mélanomes ajoutée à son implication dans la formation de métastases cérébrales en font une cible prometteuse pour les thérapies basées sur les anticorps monoclonaux. À cet effet, l'administration de L235 avant la présence même de cellules cancéreuses dans la circulation sanguine nous a permis d'évaluer son efficacité à prévenir la formation de métastases aux stades précoces de développement de tumeurs primaires. Il serait donc intéressant d'envisager l'utilisation d'anticorps humanisés reconnaissant la MTf comme traitement alternatif à la progression de divers types de cancers dont les niveaux de mMTf sont élevés. En plus de cibler la MTf à l'aide d'anticorps spécifiques, la sMTf recombinante représente un outil intéressant pour réguler l'invasion des cellules tumorales. Nous avons d'ailleurs déjà démontré que cette protéine inhibait la croissance de tumeurs sous-cutanées dérivant de glioblastome et de carcinome pulmonaire (Rolland *et al.*, 2007).

Cette étude fournit de plus amples évidences quant à la relation existant entre la

surexpression de la MTf à la surface des mélanomes et leur facilité à pénétrer le SNC pour y produire des tumeurs secondaires. De plus, nous démontrons que la migration des cellules exprimant la mMTf à travers la BHE requiert la participation du système d'activation du plasminogène. Cette étude suggère d'une part que la mMTf soit considérée comme un marqueur potentiel corrélant la probabilité de développer des métastases cérébrales et d'autre part que la mMTf représente une cible intéressante pour l'élaboration de nouvelles thérapies contre le cancer.

## CHAPITRE IV

### CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Depuis la découverte de la MTf, plusieurs études ont permis de lui attribuer un rôle certain dans la progression tumorale. Les résultats de cette thèse montrent que l'association de la MTf à la membrane plasmique favorise la formation de plasmine péricellulaire et accroît le potentiel invasif des cellules tumorales. En fait, la stimulation du système d'activation du plasminogène constitue une caractéristique principale de la MTf, que celle-ci soit soluble ou associée à la membrane plasmique. La surexpression de la mMTf par les mélanomes expliquerait en partie leur capacité supérieure à produire des métastases. Nos résultats suggèrent que la mMTf pourrait constituer une nouvelle cible thérapeutique dans la progression de certains types de cancers.

Tout comme la forme membranaire de la MTf, la sMTf recombinante interagit avec les membres du système d'activation du plasminogène. Nos résultats montrent que la sMTf recombinante stimule de manière excessive la conversion du plasminogène par le tPA dans le milieu extracellulaire. Il est possible que la sMTf recombinante protège la plasmine de son autoprotéolyse, permettant ainsi une action prolongée. Nous rapportons que l'excès de plasmine affecte directement la matrice de fibronectine des CE et conduit à leur mort par anoïkis. Nos résultats démontrent également que la sMTf recombinante inhibe la croissance de tumeurs sous-cutanées dérivées de glioblastome et de carcinomes pulmonaires. Les résultats présentés dans cette thèse nous permettent de conclure que la sMTf recombinante aurait des capacités anti-angiogéniques en bloquant la mobilisation des CE, mais également des propriétés anti-tumorales en interférant avec le caractère invasif des cellules cancéreuses. Dans l'optique de développer de nouvelles stratégies ciblant la mMTf, nos résultats

démontrent que l'utilisation d'un anticorps anti-MTf s'avère prometteuse. En plus de décroître la motilité des cellules tumorales exprimant la mMTf, le L235 réduit le développement de métastases cérébrales de mélanomes. Par conséquent, la sMTf recombinante et l'anticorps L235 présentent un intérêt thérapeutique pour interférer avec la progression tumorale et devraient être plus amplement considérés lors d'essais cliniques futurs.

Plusieurs récepteurs membranaires induisent une cascade de signalisation intracellulaire par la liaison d'un ligand. Il est probable que la liaison du plasminogène à la mMTf stimule l'activation d'une voie quelconque. Les protéines associées à la membrane par une ancre GPI sont impliquées dans la transduction de signaux pour plusieurs types cellulaires (Cary et Cooper, 2000; Bickel, 2002). En effet, ce mode d'ancrage favorise la localisation des protéines dans des microdomaines spécialisés de la membrane plasmique communément appelés « lipids raft » (Sharom et Lehto, 2002). Ces microdomaines spécialisés sont reconnus pour être enrichis en cholestérol et en sphingolipides, mais également en récepteurs transmembranaires ainsi qu'en protéines associées à la membrane plasmique par une ancre GPI. Il pourrait être important de localiser la mMTf au sein des microdomaines de la membrane plasmique de cellules cancéreuses par immunofluorescence. La présence de la mMTf dans ces régions membranaires spécialisées pourraient favoriser des interactions avec des co-récepteurs pouvant médier une réponse intra-cellulaire suite à la liaison du plasminogène à la mMTf. En effet, les « lipids rafts » sont souvent associés à l'activation de plusieurs voies de signalisation impliquant la protéine kinase C (Oka *et al.*, 1997) et certaines GTPases (Song *et al.*, 1996; Gingras *et al.*, 1998). L'uPAR est lui aussi associé à la membrane plasmique par une ancre GPI et pourrait favoriser l'association à des intégrines. La liaison de l'uPA à l'uPAR induit l'association du récepteur à des intégrines ( $\alpha 5\beta 1$  et  $\alpha 3\beta 1$ ) et à la cavéoline. Ces derniers vont agir comme médiateurs et activer la voie de signalisation de MAPK afin de favoriser l'adhésion, la prolifération et la migration des cellules. Par conséquent, l'identification de la mMTf dans les microdomaines spécialisés de la membrane plasmique, ainsi que sa participation dans l'activation de cascades de signalisation intracellulaire pourrait apporter plus d'évidences en ce qui a trait au rôle de la mMTf dans la progression tumorale.

Comme il a été mentionné précédemment, la MTf possède un motif RGD (Arg-Gly-Asp). La reconnaissance du motif RGD par certaines intégrines est important dans l'adhésion cellulaire. À cet effet, les intégrines vont favoriser l'adhésion cellulaire en reconnaissant le motif RGD de certaines matrices comme la fibronectine, la vitronectine, la laminine, et le collagène. Ainsi, tout peptide ou protéine possédant un domaine RGD interfère avec l'adhésion des cellules endothéliales et cancéreuses. La présence de ce motif RGD présent sur la sMTf recombinante pourrait entraîner une compétition de liaison avec les intégrines et réduire l'adhésion cellulaire. Il serait intéressant d'évaluer le potentiel anti-cancéreux de la sMTf au niveau de son interaction avec les intégrines. Toujours dans le même ordre d'idée, le motif RGD de la mMTf favoriserait son interaction avec les intégrines présentes à proximité. Cette interaction permettrait d'identifier de manière plus spécifique des intégrines jouant le rôle de co-récepteur de la mMTf en induisant l'activation de voies de signalisation intracellulaire. Ces informations permettraient également de mieux comprendre la signalisation intracellulaire médiée par la MTf à la membrane plasmique.

En considérant que la mMTf favorise l'invasion cérébrale des mélanomes, on pourrait penser que la mMTf favorise l'adhésion des cellules cancéreuses à l'endothélium vasculaire, puis à leur extravasation subséquente vers l'organe cible. Plusieurs molécules ont déjà été identifiées pour médier l'adhésion des cellules cancéreuses à la paroi des vaisseaux sanguins. Parmi celles-ci, la E-sélectine à la surface des cellules endothéliales favorise l'adhésion des cellules tumorales en s'associant au récepteur DR3. Cette association enclenche également l'activation de p38 et de ERK. Il est plausible que la mMTf favorise l'interaction avec certaines intégrines via la reconnaissance du motif RGD. La production de mutants de la mMTf au niveau du motif RGD permettrait de déterminer l'importance de ce domaine dans l'adhésion des cellules cancéreuses.

Étant donné que la principale caractéristique de la MTf est de stimuler la formation de plasmine grâce à sa liaison au plasminogène, il serait intéressant de déterminer le motif ou la séquence minimale impliqué dans ce processus par mutagenèse dirigée. Les essais de migrations *in vitro* permettraient de vérifier la capacité des peptides à interférer avec la motilité des cellules exprimant la mMTf. Il est déjà connu que le plasminogène lie différentes



matrices via ses domaines kringles. Ces domaines kringles sont notamment impliqués dans l'association entre le plasminogène et plusieurs membres du système de coagulation. Par conséquent, si la mMTf lie le plasminogène par la reconnaissance de domaines kringles, il est possible qu'elle lie d'autres protéines qui en possèdent, comme la thrombine, l'uPA et le HGF. Notre équipe a aussi démontré que la sMTf pouvait lier directement le plasminogène. Cette interaction pourrait favoriser la formation de Lys-plasminogène à partir de la forme native Glu-plasminogène. Il apparaît évident que l'implication de la MTf (mMTf et sMTf) dans le système d'activation du plasminogène nécessite de plus amples investigations afin de répondre à ces interrogations qui ne sont pas adressées dans cette thèse.

Finalement, il serait intéressant de vérifier la capacité de la sMTf recombinante à inhiber la croissance de tumeurs intracrâniennes primaires ou métastatiques. Notre équipe a rapporté que la sMTf recombinante traversait la BHE dans un modèle de perfusion cérébrale *in situ* (Demeule *et al.*, 2002). De même, il serait important de déterminer la dose biologique optimale de la sMTf recombinante et/ou des peptides afin d'améliorer la quantité des traitements et la concentration à administrer. En ce qui a trait l'utilisation de l'anticorps monoclonal L235, il serait intéressant d'évaluer son efficacité sur la croissance de tumeurs sous-cutanées dans un modèle tel que celui utilisé dans cette thèse. Ces données permettraient d'envisager l'utilisation du L235 à un stade plus précoce dans la progression tumorale.

## APPENDICE A

### CONTRIBUTIONS

**A.1 Compound and method for regulating plasminogen activation and cell migration.** (Brevet : CA2525243; WO2004099410; WO2004099410; EP1626735; EU04731567.7). Béliveau R., M. Demeule, Y. Bertrand, J. Michaud-Levesque, Y. Rolland et J. Jodoin.

**A.2 Tumor environment dictates medulloblastoma cancer stem cell expression and invasive phenotype.** Annabi, B., S. Rojas-Sutterlin, C. Laflamme, M.P. Lachambre, Y. Rolland, H. Sartelet et R. Béliveau. (2008) *Mol. Cancer Res.*, vol. 6 (6), p. 907-916.

**A.3 Inhibition of endothelial cells movement and tubulogenesis by human recombinant soluble melanotransferrin : involvement of the u-PAR/LRP plasminolytic system.** Michaud-Levesque, J., Y. Rolland, M. Demeule, Y. Bertrand et R. Béliveau. (2005) *Biochim. Biophys. Acta*, vol.1743, p.243-253.

**A.4 Down-regulation of caveolin-1 in glioma vasculature : modulation by radiotherapy.** Régina, A., J. Jodoin, P. Khoeir, Y. Rolland, F. Berthelet, R. Moumdjian, L. Fenart, R. Cecchelli, M. Demeule et R. Béliveau. (2004) *J Neurosci. Res.*, vol. 75 (2), p. 291-299.

**A.5 Regulation of plasminogen activation : a role for melanotransferrin (p97) in cell migration.** Demeule, M., Y. Bertrand, J. Michaud-Levesque, J. Jodoin, Y. Rolland, R. Gabathuler et R. Béliveau. (2003) *Blood*, vol. 102 (5), p.1723-1731.

## RÉFÉRENCES

- Abbott, N.J. et I.A. Romero. 1996. «Transporting therapeutics across the blood-brain barrier». *Mol Med Today*, vol. 2, p. 106-113.
- Aimes, R.T. et J.P. Quigley. 1995. «Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments». *J Biol Chem*, vol. 270, p. 5872-5876.
- Akagi, Y., W. Liu, B. Zebrowski, K. Xie et L.M. Ellis. 1998. «Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human colon cancer by insulin-like growth factor-I». *Cancer Res*, vol. 58, p. 4008-4014.
- Aleman, R., M.R. Vila, C. Franci, G. Egea, F.X. Real et T.M. Thomson. 1993. «Glycosyl phosphatidylinositol membrane anchoring of melanotransferrin (p97): apical compartmentalization in intestinal epithelial cells». *J Cell Sci*, vol. 104 ( Pt 4), p. 1155-1162.
- Allan, J.A., A.J. Docherty, P.J. Barker, N.S. Huskisson, J.J. Reynolds et G. Murphy. 1995. «Binding of gelatinases A and B to type-I collagen and other matrix components». *Biochem J*, vol. 309 ( Pt 1), p. 299-306.
- Amin, W., B.Y. Karlan et B.A. Littlefield. 1987. «Glucocorticoid sensitivity of OVCA 433 human ovarian carcinoma cells: inhibition of plasminogen activators, cell growth, and morphological alterations». *Cancer Res*, vol. 47, p. 6040-6045.
- Andreasen, P.A., B. Georg, L.R. Lund, A. Riccio et S.N. Stacey. 1990. «Plasminogen activator inhibitors: hormonally regulated serpins». *Mol Cell Endocrinol*, vol. 68, p. 1-19.
- Andreasen, P.A., L. Sottrup-Jensen, L. Kjoller, A. Nykjaer, S.K. Moestrup, C.M. Petersen et J. Gliemann. 1994. «Receptor-mediated endocytosis of plasminogen activators and activator/inhibitor complexes». *FEBS Lett*, vol. 338, p. 239-245.
- Andreasen, P.A., L. Kjoller, L. Christensen et M.J. Duffy. 1997. «The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review». *Int J Cancer*, vol. 72, p. 1-22.
- Andreasen, P.A., R. Egelund et H.H. Petersen. 2000. «The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis». *Cell Mol Life Sci*, vol. 57, p. 25-40.
- Aoki, T., T. Sumii, T. Mori, X. Wang et E.H. Lo. 2002. «Blood-brain barrier disruption and matrix metalloproteinase-9 expression during reperfusion injury: mechanical versus embolic focal ischemia in spontaneously hypertensive rats». *Stroke; a journal of cerebral circulation*, vol. 33, p. 2711-2717.

Aschner, M. 1998. «Blood-brain barrier : Physiological and fonctionnal considerations.». In: *Handbook of neurotoxicology*, p. 339-351: Academic Press.

Bajou, K., V. Masson, R.D. Gerard, P.M. Schmitt, V. Albert, M. Praus, L.R. Lund, T.L. Frandsen, N. Brunner, K. Dano, N.E. Fusenig, U. Weidle, G. Carmeliet, D. Loskutoff, D. Collen, P. Carmeliet, J.M. Foidart et A. Noel. 2001. «The plasminogen activator inhibitor PAI-1 controls in vivo tumor vascularization by interaction with proteases, not vitronectin. Implications for antiangiogenic strategies». *The Journal of cell biology*, vol. 152, p. 777-784.

Baker, E.N., H.M. Baker, C.A. Smith, M.R. Stebbins, M. Kahn, K.E. Hellstrom et I. Hellstrom. 1992. «Human melanotransferrin (p97) has only one functional iron-binding site». *FEBS Lett*, vol. 298, p. 215-218.

Baker, E.N. et P.F. Lindley. 1992. «New perspectives on the structure and function of transferrins». *J Inorg Biochem*, vol. 47, p. 147-160.

Behrem, S., K. Zarkovic, N. Eskinja et N. Jonjic. 2005. «Endoglin is a better marker than CD31 in evaluation of angiogenesis in glioblastoma». *Croat Med J*, vol. 46, p. 417-422.

Belgore, F.M., A.D. Blann et G.Y. Lip. 2000. «sFlt-1, a potential antagonist for exogenous VEGF». *Circulation*, vol. 102, p. E108-109.

Belin, D., A. Wohlwend, W.D. Schleuning, E.K. Kruithof et J.D. Vassalli. 1989. «Facultative polypeptide translocation allows a single mRNA to encode the secreted and cytosolic forms of plasminogen activators inhibitor 2». *EMBO J*, vol. 8, p. 3287-3294.

Bergers, G. et L.E. Benjamin. 2003. «Tumorigenesis and the angiogenic switch». *Nat Rev Cancer*, vol. 3, p. 401-410.

Bertrand, Y., M. Demeule, G.E. Rivard et R. Beliveau. 2006. «Stimulation of tPA-dependent provisional extracellular fibrin matrix degradation by human recombinant soluble melanotransferrin». *Biochim Biophys Acta*, vol. 1763, p. 1024-1030.

Bertrand, Y., M. Demeule, J. Michaud-Levesque et R. Beliveau. 2007. «Melanotransferrin induces human melanoma SK-Mel-28 cell invasion in vivo». *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 353, p. 418-423.

Bian, X.W., X.F. Jiang, J.H. Chen, J.S. Bai, C. Dai, Q.L. Wang, J.Y. Lu, W. Zhao, R. Xin, M.Y. Liu, J.Q. Shi et J.M. Wang. 2006. «Increased angiogenic capabilities of endothelial cells from microvessels of malignant human gliomas». *Int Immunopharmacol*, vol. 6, p. 90-99.

Bickel, P.E. 2002. «Lipid rafts and insulin signaling». *American journal of physiology*, vol. 282, p. E1-E10.

Bilato, C., K.A. Curto, R.E. Monticone, R.R. Pauly, A.J. White et M.T. Crow. 1997. «The inhibition of vascular smooth muscle cell migration by peptide and antibody antagonists of

the  $\alpha v \beta 3$  integrin complex is reversed by activated calcium/calmodulin- dependent protein kinase II». *The Journal of clinical investigation*, vol. 100, p. 693-704.

Bird, M.I., M.R. Foster, R. Priest et R. Malhotra. 1997. «Selectins: physiological and pathophysiological roles». *Biochem Soc Trans*, vol. 25, p. 1199-1206.

Blagosklonny, M.V. 2005. «Carcinogenesis, cancer therapy and chemoprevention». *Cell death and differentiation*, vol. 12, p. 592-602.

Blasi, F. 1997. «uPA, uPAR, PAI-1: key intersection of proteolytic, adhesive and chemotactic highways?». *Immunol Today*, vol. 18, p. 415-417.

Bohle, A.S. et H. Kalthoff. 1999. «Molecular mechanisms of tumor metastasis and angiogenesis». *Langenbeck's archives of surgery / Deutsche Gesellschaft fur Chirurgie*, vol. 384, p. 133-140.

Bonnefoy, A. et C. Legrand. 2000. «Proteolysis of subendothelial adhesive glycoproteins (fibronectin, thrombospondin, and von Willebrand factor) by plasmin, leukocyte cathepsin G, and elastase». *Thrombosis research*, vol. 98, p. 323-332.

Boucher, P., M. Gotthardt, W.P. Li, R.G. Anderson et J. Herz. 2003. «LRP: role in vascular wall integrity and protection from atherosclerosis». *Science (New York, N.Y.)*, vol. 300, p. 329-332.

Brodts, P., L. Fallavollita, R.S. Bresalier, S. Meterissian, C.R. Norton et B.A. Wolitzky. 1997. «Liver endothelial E-selectin mediates carcinoma cell adhesion and promotes liver metastasis». *Int J Cancer*, vol. 71, p. 612-619.

Brown, J.P., K. Nishiyama, I. Hellstrom et K.E. Hellstrom. 1981a. «Structural characterization of human melanoma-associated antigen p97 with monoclonal antibodies». *J Immunol*, vol. 127, p. 539-546.

Brown, J.P., R.G. Woodbury, C.E. Hart, I. Hellstrom et K.E. Hellstrom. 1981b. «Quantitative analysis of melanoma-associated antigen p97 in normal and neoplastic tissues». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 78, p. 539-543.

Brown, J.P., R.M. Hewick, I. Hellstrom, K.E. Hellstrom, R.F. Doolittle et W.J. Dreyer. 1982. «Human melanoma-associated antigen p97 is structurally and functionally related to transferrin». *Nature*, vol. 296, p. 171-173.

Bruse, C., D. Radu et A. Bergqvist. 2004. «In situ localization of mRNA for the fibrinolytic factors uPA, PAI-1 and uPAR in endometriotic and endometrial tissue». *Mol Hum Reprod*, vol. 10, p. 159-166.

Bu, G., S. Williams, D.K. Strickland et A.L. Schwartz. 1992. «Low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor is an hepatic receptor for tissue-type plasminogen activator». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 89, p. 7427-7431.

- Buckley, C.D., D. Pilling, N.V. Henriquez, G. Parsonage, K. Threlfall, D. Scheel-Toellner, D.L. Simmons, A.N. Akbar, J.M. Lord et M. Salmon. 1999. «RGD peptides induce apoptosis by direct caspase-3 activation». *Nature*, vol. 397, p. 534-539.
- Bugge, T.H., M.J. Flick, C.C. Daugherty et J.L. Degen. 1995. «Plasminogen deficiency causes severe thrombosis but is compatible with development and reproduction». *Genes Dev*, vol. 9, p. 794-807.
- Cameron, M.D., E.E. Schmidt, N. Kerkvliet, K.V. Nadkarni, V.L. Morris, A.C. Groom, A.F. Chambers et I.C. MacDonald. 2000. «Temporal progression of metastasis in lung: cell survival, dormancy, and location dependence of metastatic inefficiency». *Cancer Res*, vol. 60, p. 2541-2546.
- Campbell, N.E. et R. Mathieu. 1995. «Circulation et échanges gazeux». In: *Biologie*, p. 822-825. Montréal: Éditions du Renouveau Pédagogique.
- Campo, E., M.J. Merino, F.A. Tavassoli, A.S. Charonis, W.G. Stetler-Stevenson et L.A. Liotta. 1992. «Evaluation of basement membrane components and the 72 kDa type IV collagenase in serous tumors of the ovary». *Am J Surg Pathol*, vol. 16, p. 500-507.
- Cao, R., J. Farnebo, M. Kurimoto et Y. Cao. 1999. «Interleukin-18 acts as an angiogenesis and tumor suppressor». *FASEB J*, vol. 13, p. 2195-2202.
- Cao, Y. 1999. «Therapeutic potentials of angiostatin in the treatment of cancer». *Haematologica*, vol. 84, p. 643-650.
- Carlevaro, M.F., A. Albin, D. Ribatti, C. Gentili, R. Benelli, S. Cermelli, R. Cancedda et F.D. Cancedda. 1997. «Transferrin promotes endothelial cell migration and invasion: implication in cartilage neovascularization». *J Cell Biol*, vol. 136, p. 1375-1384.
- Carmeliet, P., L. Schoonjans, L. Kieckens, B. Ream, J. Degen, R. Bronson, R. De Vos, J.J. van den Oord, D. Collen et R.C. Mulligan. 1994. «Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice». *Nature*, vol. 368, p. 419-424.
- Carmeliet, P. et R.K. Jain. 2000. «Angiogenesis in cancer and other diseases». *Nature*, vol. 407, p. 249-257.
- Carmeliet, P. 2005. «Angiogenesis in life, disease and medicine». *Nature*, vol. 438, p. 932-936.
- Cary, L.A. et J.A. Cooper. 2000. «Molecular switches in lipid rafts». *Nature*, vol. 404, p. 945, 947.
- Castellino, F.J. et V.A. Ploplis. 2005. «Structure and function of the plasminogen/plasmin system». *Thromb Haemost*, vol. 93, p. 647-654.
- Cavallaro, U., S. Liebner et E. Dejana. 2006. «Endothelial cadherins and tumor

angiogenesis». *Exp Cell Res*, vol. 312, p. 659-667.

Chang, J.E., H.I. Robins et M.P. Mehta. 2007. «Therapeutic advances in the treatment of brain metastases». *Clin Adv Hematol Oncol*, vol. 5, p. 54-64.

Choi, E.T., L. Engel, A.D. Callow, S. Sun, J. Trachtenberg, S. Santoro et U.S. Ryan. 1994. «Inhibition of neointimal hyperplasia by blocking alpha V beta 3 integrin with a small peptide antagonist GpenGRGDSPCA». *J Vasc Surg*, vol. 19, p. 125-134.

Classon, M. et E. Harlow. 2002. «The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer». *Nat Rev Cancer*, vol. 2, p. 910-917.

Clavel, C., M. Polette, M. Doco, I. Binniger et P. Birembaut. 1992. «Immunolocalization of matrix metallo-proteinases and their tissue inhibitor in human mammary pathology». *Bull Cancer*, vol. 79, p. 261-270.

Cleaver, O. et D.A. Melton. 2003. «Endothelial signaling during development». *Nat Med*, vol. 9, p. 661-668.

Cobleigh, M.A., V.K. Langmuir, G.W. Sledge, K.D. Miller, L. Haney, W.F. Novotny, J.D. Reimann et A. Vassel. 2003. «A phase I/II dose-escalation trial of bevacizumab in previously treated metastatic breast cancer». *Semin Oncol*, vol. 30, p. 117-124.

Collen, D. 1999. «The plasminogen (fibrinolytic) system». *Thromb Haemost*, vol. 82, p. 259-270.

Conway, E.M., D. Collen et P. Carmeliet. 2001. «Molecular mechanisms of blood vessel growth». *Cardiovasc Res*, vol. 49, p. 507-521.

Cranmer, L.D., K.T. Trevor, S. Bandlamuri et E.M. Hersh. 2005. «Rodent models of brain metastasis in melanoma». *Melanoma Res*, vol. 15, p. 325-356.

Dano, K., P.A. Andreasen, J. Grondahl-Hansen, P. Kristensen, L.S. Nielsen et L. Skriver. 1985. «Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer». *Adv Cancer Res*, vol. 44, p. 139-266.

Davis, G.E. et D.R. Senger. 2005. «Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization». *Circ Res*, vol. 97, p. 1093-1107.

de Bock, C.E. et Y. Wang. 2004. «Clinical significance of urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) expression in cancer». *Med Res Rev*, vol. 24, p. 13-39.

De Petro, G., D. Taviani, A. Copeta, N. Portolani, S.M. Giulini et S. Barlati. 1998. «Expression of urokinase-type plasminogen activator (u-PA), u-PA receptor, and tissue-type PA messenger RNAs in human hepatocellular carcinoma». *Cancer research*, vol. 58, p. 2234-2239.

- Del Rosso, M., G. Fibbi, M. Pucci, F. Margheri et S. Serrati. 2008. «The plasminogen activation system in inflammation». *Front Biosci*, vol. 13, p. 4667-4686.
- Demeule, M., J. Poirier, J. Jodoin, Y. Bertrand, R.R. Desrosiers, C. Dagenais, T. Nguyen, J. Lanthier, R. Gabathuler, M. Kennard, W.A. Jefferies, D. Karkan, S. Tsai, L. Fenart, R. Cecchelli et R. Beliveau. 2002. «High transcytosis of melanotransferrin (P97) across the blood-brain barrier». *J Neurochem*, vol. 83, p. 924-933.
- Demeule, M., Y. Bertrand, J. Michaud-Levesque, J. Jodoin, Y. Rolland, R. Gabathuler et R. Beliveau. 2003. «Regulation of plasminogen activation: a role for melanotransferrin (p97) in cell migration». *Blood*, vol. 102, p. 1723-1731.
- Denijn, M. et D.J. Ruiter. 1993. «The possible role of angiogenesis in the metastatic potential of human melanoma. Clinicopathological aspects». *Melanoma Res*, vol. 3, p. 5-14.
- Desrosiers, R.R., Y. Bertrand, Q.T. Nguyen, M. Demeule, R. Gabathuler, M.L. Kennard, S. Gauthier et R. Beliveau. 2003. «Expression of melanotransferrin isoforms in human serum: relevance to Alzheimer's disease». *Biochem J*, vol. 374, p. 463-471.
- Dohrmann, G.J. 1970. «The choroid plexus: a historical review». *Brain Res*, vol. 18, p. 197-218.
- Doolittle, N.D., A. Petrillo, S. Bell, P. Cummings et S. Eriksen. 1998. «Blood-brain barrier disruption for the treatment of malignant brain tumors: The National Program». *J Neurosci Nurs*, vol. 30, p. 81-90.
- Duffy, M.J. 2002. «Urokinase-type plasminogen activator: a potent marker of metastatic potential in human cancers». *Biochem Soc Trans*, vol. 30, p. 207-210.
- Dunn, L.L., E.O. Sekyere, Y.S. Rahmanto et D.R. Richardson. 2006. «The function of melanotransferrin: a role in melanoma cell proliferation and tumorigenesis». *Carcinogenesis*, vol. 27, p. 2157-2169.
- Eliceiri, B.P., R. Paul, P.L. Schwartzberg, J.D. Hood, J. Leng et D.A. Cheresh. 1999. «Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability». *Mol Cell*, vol. 4, p. 915-924.
- Enholm, B., K. Paavonen, A. Ristimäki, V. Kumar, Y. Gunji, J. Klefstrom, L. Kivinen, M. Laiho, B. Olofsson, V. Joukov, U. Eriksson et K. Alitalo. 1997. «Comparison of VEGF, VEGF-B, VEGF-C and Ang-1 mRNA regulation by serum, growth factors, oncoproteins and hypoxia». *Oncogene*, vol. 14, p. 2475-2483.
- Estin, C.D., U.S. Stevenson, G.D. Plowman, S.L. Hu, P. Sridhar, I. Hellstrom, J.P. Brown et K.E. Hellstrom. 1988. «Recombinant vaccinia virus vaccine against the human melanoma antigen p97 for use in immunotherapy». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 85, p. 1052-1056.
- Ferrara, N. et W.J. Henzel. 1989. «Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding



growth factor specific for vascular endothelial cells». *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 161, p. 851-858.

Ferrara, N. et T. Davis-Smyth. 1997. «The biology of vascular endothelial growth factor». *Endocr Rev*, vol. 18, p. 4-25.

Ferrara, N. 1999. «Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects». *Curr Top Microbiol Immunol*, vol. 237, p. 1-30.

Ferrara, N., H.P. Gerber et J. LeCouter. 2003. «The biology of VEGF and its receptors». *Nat Med*, vol. 9, p. 669-676.

Fidler, I.J., G. Schackert, R.D. Zhang, R. Radinsky et T. Fujimaki. 1999. «The biology of melanoma brain metastasis». *Cancer Metastasis Rev*, vol. 18, p. 387-400.

Fidler, I.J. 2002. «Critical determinants of metastasis». *Semin Cancer Biol*, vol. 12, p. 89-96.

Fidler, I.J. 2003. «The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited». *Nat Rev Cancer*, vol. 3, p. 453-458.

Fillebeen, C., L. Descamps, M.P. Dehouck, L. Fenart, M. Benaissa, G. Spik, R. Cecchelli et A. Pierce. 1999. «Receptor-mediated transcytosis of lactoferrin through the blood-brain barrier». *J Biol Chem*, vol. 274, p. 7011-7017.

Folkman, J., E. Merler, C. Abernathy et G. Williams. 1971. «Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis». *J Exp Med*, vol. 133, p. 275-288.

Folkman, J. et Y. Shing. 1992. «Angiogenesis». *J Biol Chem*, vol. 267, p. 10931-10934.

Folkman, J. 1995a. «Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease». *Nat Med*, vol. 1, p. 27-31.

Folkman, J. 1995b. «Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis». *N Engl J Med*, vol. 333, p. 1757-1763.

Folkman, J. 2003. «Fundamental concepts of the angiogenic process». *Curr Mol Med*, vol. 3, p. 643-651.

Food, M.R., S. Rothenberger, R. Gabathuler, I.D. Haidl, G. Reid et W.A. Jefferies. 1994. «Transport and expression in human melanomas of a transferrin-like glycosylphosphatidylinositol-anchored protein». *J Biol Chem*, vol. 269, p. 3034-3040.

Food, M.R., E.O. Sekyere et D.R. Richardson. 2002. «The soluble form of the membrane-bound transferrin homologue, melanotransferrin, inefficiently donates iron to cells via nonspecific internalization and degradation of the protein». *Eur J Biochem*, vol. 269, p. 4435-4445.

- Fukai, F., M. Mashimo, K. Akiyama, T. Goto, S. Tanuma et T. Katayama. 1998. «Modulation of apoptotic cell death by extracellular matrix proteins and a fibronectin-derived antiadhesive peptide». *Experimental cell research*, vol. 242, p. 92-99.
- Fukumura, D., R. Xavier, T. Sugiura, Y. Chen, E.C. Park, N. Lu, M. Selig, G. Nielsen, T. Taksir, R.K. Jain et B. Seed. 1998. «Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells». *Cell*, vol. 94, p. 715-725.
- Garratt, R.C. et H. Jhoti. 1992. «A molecular model for the tumour-associated antigen, p97, suggests a Zn-binding function». *FEBS Lett*, vol. 305, p. 55-61.
- Giancotti, F.G. 2000. «Complexity and specificity of integrin signalling». *Nat Cell Biol*, vol. 2, p. E13-14.
- Gingras, D., F. Gauthier, S. Lamy, R.R. Desrosiers et R. Beliveau. 1998. «Localization of RhoA GTPase to endothelial caveolae-enriched membrane domains». *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 247, p. 888-893.
- Goldberg, G.I., A. Strongin, I.E. Collier, L.T. Genrich et B.L. Marmer. 1992. «Interaction of 92-kDa type IV collagenase with the tissue inhibitor of metalloproteinases prevents dimerization, complex formation with interstitial collagenase, and activation of the proenzyme with stromelysin». *The Journal of biological chemistry*, vol. 267, p. 4583-4591.
- Gomez, D.E., D.F. Alonso, H. Yoshiji et U.P. Thorgeirsson. 1997. «Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions». *European journal of cell biology*, vol. 74, p. 111-122.
- Gout, S., P.L. Tremblay et J. Huot. 2008. «Selectins and selectin ligands in extravasation of cancer cells and organ selectivity of metastasis». *Clin Exp Metastasis*, vol. 25, p. 335-344.
- Gris, J.C., J.F. Schved, C. Marty-Double, J.M. Mauboussin et P. Balmes. 1993. «Immunohistochemical study of tumor cell-associated plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors in lung carcinomas». *Chest*, vol. 104, p. 8-13.
- Guan, J.L. et R.O. Hynes. 1990. «Lymphoid cells recognize an alternatively spliced segment of fibronectin via the integrin receptor alpha 4 beta 1». *Cell*, vol. 60, p. 53-61.
- Hackel, C., B. Czerniak, A.G. Ayala, K. Radig et A. Roessner. 1997. «Expression of plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor 1 in dedifferentiated chondrosarcoma». *Cancer*, vol. 79, p. 53-58.
- Hadden, H.L. et C.A. Henke. 2000. «Induction of lung fibroblast apoptosis by soluble fibronectin peptides». *American journal of respiratory and critical care medicine*, vol. 162, p. 1553-1560.
- Hahn-Dantona, E., J.F. Ruiz, P. Bornstein et D.K. Strickland. 2001. «The low density lipoprotein receptor-related protein modulates levels of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9)

by mediating its cellular catabolism». *The Journal of biological chemistry*, vol. 276, p. 15498-15503.

Hellstrom, M., M. Kalen, P. Lindahl, A. Abramsson et C. Betsholtz. 1999. «Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse». *Development*, vol. 126, p. 3047-3055.

Herz, J., R.C. Kowal, J.L. Goldstein et M.S. Brown. 1990. «Proteolytic processing of the 600 kd low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) occurs in a trans-Golgi compartment». *EMBO J*, vol. 9, p. 1769-1776.

Herz, J. et D.K. Strickland. 2001. «LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor». *J Clin Invest*, vol. 108, p. 779-784.

Herz, J. et H.H. Bock. 2002. «Lipoprotein receptors in the nervous system». *Annual review of biochemistry*, vol. 71, p. 405-434.

Hoeben, A., B. Landuyt, M.S. Highley, H. Wildiers, A.T. Van Oosterom et E.A. De Bruijn. 2004. «Vascular endothelial growth factor and angiogenesis». *Pharmacol Rev*, vol. 56, p. 549-580.

Holmgren, L., M.S. O'Reilly et J. Folkman. 1995. «Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression». *Nature medicine*, vol. 1, p. 149-153.

Hori, A., R. Sasada, E. Matsutani, K. Naito, Y. Sakura, T. Fujita et Y. Kozai. 1991. «Suppression of solid tumor growth by immunoneutralizing monoclonal antibody against human basic fibroblast growth factor». *Cancer Res*, vol. 51, p. 6180-6184.

Hori, S., S. Ohtsuki, K. Hosoya, E. Nakashima et T. Terasaki. 2004. «A pericyte-derived angiopoietin-1 multimeric complex induces occludin gene expression in brain capillary endothelial cells through Tie-2 activation in vitro». *J Neurochem*, vol. 89, p. 503-513.

Huot, J., F. Houle, S. Rousseau, R.G. Deschesnes, G.M. Shah et J. Landry. 1998. «SAPK2/p38-dependent F-actin reorganization regulates early membrane blebbing during stress-induced apoptosis». *J Cell Biol*, vol. 143, p. 1361-1373.

Hurwitz, H., L. Fehrenbacher, W. Novotny, T. Cartwright, J. Hainsworth, W. Heim, J. Berlin, A. Baron, S. Griffing, E. Holmgren, N. Ferrara, G. Fyfe, B. Rogers, R. Ross et F. Kabbinavar. 2004. «Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer». *N Engl J Med*, vol. 350, p. 2335-2342.

Ichinose, A., K. Fujikawa et T. Suyama. 1986. «The activation of pro-urokinase by plasma kallikrein and its inactivation by thrombin». *J Biol Chem*, vol. 261, p. 3486-3489.

Idell, S. 2002. «Endothelium and disordered fibrin turnover in the injured lung: newly recognized pathways». *Crit Care Med*, vol. 30, p. S274-280.

- Jefferies, W.A., M.R. Food, R. Gabathuler, S. Rothenberger, T. Yamada, O. Yasuhara et P.L. McGeer. 1996. «Reactive microglia specifically associated with amyloid plaques in Alzheimer's disease brain tissue express melanotransferrin». *Brain Res*, vol. 712, p. 122-126.
- Jeong, J., I. Han, Y. Lim, J. Kim, I. Park, A. Woods, J.R. Couchman et E.S. Oh. 2001. «Rat embryo fibroblasts require both the cell-binding and the heparin-binding domains of fibronectin for survival». *The Biochemical journal*, vol. 356, p. 531-537.
- Kahn, M., H. Sugawara, P. McGowan, K. Okuno, S. Nagoya, K.E. Hellstrom, I. Hellstrom et P. Greenberg. 1991. «CD4+ T cell clones specific for the human p97 melanoma-associated antigen can eradicate pulmonary metastases from a murine tumor expressing the p97 antigen». *J Immunol*, vol. 146, p. 3235-3241.
- Kawamoto, T., H. Pan, W. Yan, H. Ishida, E. Usui, R. Oda, K. Nakamasu, M. Noshiro, Y. Kawashima-Ohya, M. Fujii, H. Shintani, Y. Okada et Y. Kato. 1998. «Expression of membrane-bound transferrin-like protein p97 on the cell surface of chondrocytes». *Eur J Biochem*, vol. 256, p. 503-509.
- Kendall, R.L. et K.A. Thomas. 1993. «Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 90, p. 10705-10709.
- Kendall, R.L., G. Wang et K.A. Thomas. 1996. «Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR». *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 226, p. 324-328.
- Kennard, M.L., D.R. Richardson, R. Gabathuler, P. Ponka et W.A. Jefferies. 1995. «A novel iron uptake mechanism mediated by GPI-anchored human p97». *Embo J*, vol. 14, p. 4178-4186.
- Kennard, M.L., H. Feldman, T. Yamada et W.A. Jefferies. 1996. «Serum levels of the iron binding protein p97 are elevated in Alzheimer's disease». *Nat Med*, vol. 2, p. 1230-1235.
- Kim, C.W., K.N. Son, S.Y. Choi et J. Kim. 2006. «Human lactoferrin upregulates expression of KDR/Flk-1 and stimulates VEGF-A-mediated endothelial cell proliferation and migration». *FEBS Lett*, vol. 580, p. 4332-4336.
- Kim, D.K., M.Y. Seo, S.W. Lim, S. Kim, J.W. Kim, B.J. Carroll, D.Y. Kwon, T. Kwon et S.S. Kang. 2001. «Serum melanotransferrin, p97 as a biochemical marker of Alzheimer's disease». *Neuropsychopharmacology*, vol. 25, p. 84-90.
- Kim, K.J., B. Li, J. Winer, M. Armanini, N. Gillett, H.S. Phillips et N. Ferrara. 1993. «Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo». *Nature*, vol. 362, p. 841-844.
- Klemke, R.L., S. Cai, A.L. Giannini, P.J. Gallagher, P. de Lanerolle et D.A. Cheresh. 1997. «Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase». *J Cell Biol*, vol. 137, p.

481-492.

Kobayashi, H., M. Schmitt, L. Goretzki, N. Chucholowski, J. Calvete, M. Kramer, W.A. Gunzler, F. Janicke et H. Graeff. 1991. «Cathepsin B efficiently activates the soluble and the tumor cell receptor-bound form of the proenzyme urokinase-type plasminogen activator (Pro-uPA)». *J Biol Chem*, vol. 266, p. 5147-5152.

Koch, A.E., M.M. Halloran, C.J. Haskell, M.R. Shah et P.J. Polverini. 1995. «Angiogenesis mediated by soluble forms of E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1». *Nature*, vol. 376, p. 517-519.

Kockx, M.M. et A.G. Herman. 2000. «Apoptosis in atherosclerosis: beneficial or detrimental?». *Cardiovascular research*, vol. 45, p. 736-746.

Komenaka, I., H. Hoerig et H.L. Kaufman. 2004. «Immunotherapy for melanoma». *Clin Dermatol*, vol. 22, p. 251-265.

Kook, Y.H., J. Adamski, A. Zelent et L. Ossowski. 1994. «The effect of antisense inhibition of urokinase receptor in human squamous cell carcinoma on malignancy». *EMBO J*, vol. 13, p. 3983-3991.

Koolwijk, P., N. Sidenius, E. Peters, C.F. Sier, R. Hanemaaijer, F. Blasi et V.W. van Hinsbergh. 2001. «Proteolysis of the urokinase-type plasminogen activator receptor by metalloproteinase-12: implication for angiogenesis in fibrin matrices». *Blood*, vol. 97, p. 3123-3131.

Kopfstein, L. et G. Christofori. 2006. «Metastasis: cell-autonomous mechanisms versus contributions by the tumor microenvironment». *Cell Mol Life Sci*, vol. 63, p. 449-468.

Kounnas, M.Z., J. Henkin, W.S. Argraves et D.K. Strickland. 1993. «Low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor mediates cellular uptake of pro-urokinase». *J Biol Chem*, vol. 268, p. 21862-21867.

Krizanac-Bengez, L., M. Kapural, F. Parkinson, L. Cucullo, M. Hossain, M.R. Mayberg et D. Janigro. 2003. «Effects of transient loss of shear stress on blood-brain barrier endothelium: role of nitric oxide and IL-6». *Brain Res*, vol. 977, p. 239-246.

Kumar, P., J.M. Wang et C. Bernabeu. 1996. «CD 105 and angiogenesis». *J Pathol*, vol. 178, p. 363-366.

La, M. et J.J. Reid. 1995. «Endothelin-1 and the regulation of vascular tone». *Clin Exp Pharmacol Physiol*, vol. 22, p. 315-323.

Lamallice, L., F. Houle, G. Jourdan et J. Huot. 2004. «Phosphorylation of tyrosine 1214 on VEGFR2 is required for VEGF-induced activation of Cdc42 upstream of SAPK2/p38». *Oncogene*, vol. 23, p. 434-445.

Lamallice, L., F. Le Boeuf et J. Huot. 2007. «Endothelial cell migration during angiogenesis». *Circulation research*, vol. 100, p. 782-794.

Lee, B.C., T.H. Lee, S. Avraham et H.K. Avraham. 2004. «Involvement of the chemokine receptor CXCR4 and its ligand stromal cell-derived factor 1alpha in breast cancer cell migration through human brain microvascular endothelial cells». *Mol Cancer Res*, vol. 2, p. 327-338.

Lee, G., S. Dallas, M. Hong et R. Bendayan. 2001. «Drug transporters in the central nervous system: brain barriers and brain parenchyma considerations». *Pharmacol Rev*, vol. 53, p. 569-596.

Lee, T.H., H.K. Avraham, S. Jiang et S. Avraham. 2003. «Vascular endothelial growth factor modulates the transendothelial migration of MDA-MB-231 breast cancer cells through regulation of brain microvascular endothelial cell permeability». *J Biol Chem*, vol. 278, p. 5277-5284.

Leon, S.P., R.D. Folkerth et P.M. Black. 1996. «Microvessel density is a prognostic indicator for patients with astroglial brain tumors». *Cancer*, vol. 77, p. 362-372.

Li, B., W.D. Zhao, Z.M. Tan, W.G. Fang, L. Zhu et Y.H. Chen. 2006. «Involvement of Rho/ROCK signalling in small cell lung cancer migration through human brain microvascular endothelial cells». *FEBS Lett*, vol. 580, p. 4252-4260.

Li, C., I.N. Hampson, L. Hampson, P. Kumar, C. Bernabeu et S. Kumar. 2000. «CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor beta1 on human vascular endothelial cells». *Faseb J*, vol. 14, p. 55-64.

Li, S., N.F. Huang et S. Hsu. 2005. «Mechanotransduction in endothelial cell migration». *J Cell Biochem*, vol. 96, p. 1110-1126.

Li, Y., J.M. Knisely, W. Lu, L.M. McCormick, J. Wang, J. Henkin, A.L. Schwartz et G. Bu. 2002. «Low density lipoprotein (LDL) receptor-related protein 1B impairs urokinase receptor regeneration on the cell surface and inhibits cell migration». *J Biol Chem*, vol. 277, p. 42366-42371.

Lindgren, M., M. Johansson, J. Sandstrom, Y. Jonsson, A.T. Bergenheim et R. Henriksson. 1997. «VEGF and tPA co-expressed in malignant glioma». *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)*, vol. 36, p. 615-618.

Lisanti, M.P., I.W. Caras, M.A. Davitz et E. Rodriguez-Boulton. 1989. «A glycopospholipid membrane anchor acts as an apical targeting signal in polarized epithelial cells». *J Cell Biol*, vol. 109, p. 2145-2156.

Liu, G., M.A. Shuman et R.L. Cohen. 1995. «Co-expression of urokinase, urokinase receptor and PAI-1 is necessary for optimum invasiveness of cultured lung cancer cells». *Int J Cancer*, vol. 60, p. 501-506.

- Llorente-Cortes, V. et L. Badimon. 2005. «LDL receptor-related protein and the vascular wall: implications for atherothrombosis». *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 25, p. 497-504.
- Lyons, R.M., L.E. Gentry, A.F. Purchio et H.L. Moses. 1990. «Mechanism of activation of latent recombinant transforming growth factor beta 1 by plasmin». *J Cell Biol*, vol. 110, p. 1361-1367.
- Ma, J., S. Pulfer, S. Li, J. Chu, K. Reed et J.M. Gallo. 2001. «Pharmacodynamic-mediated reduction of temozolomide tumor concentrations by the angiogenesis inhibitor TNP-470». *Cancer Res*, vol. 61, p. 5491-5498.
- Malingre, M.M., J.H. Beijnen, H. Rosing, F.J. Koopman, R.C. Jewell, E.M. Paul, W.W. Ten Bokkel Huinink et J.H. Schellens. 2001. «Co-administration of GF120918 significantly increases the systemic exposure to oral paclitaxel in cancer patients». *Br J Cancer*, vol. 84, p. 42-47.
- Mathieu, A., M. Remmelink, N. D'Haene, S. Penant, J.F. Gaussin, R. Van Ginckel, F. Darro, R. Kiss et I. Salmon. 2004. «Development of a chemoresistant orthotopic human nonsmall cell lung carcinoma model in nude mice: analyses of tumor heterogeneity in relation to the immunohistochemical levels of expression of cyclooxygenase-2, ornithine decarboxylase, lung-related resistance protein, prostaglandin E synthetase, and glutathione-S-transferase-alpha (GST)-alpha, GST-mu, and GST-pi». *Cancer*, vol. 101, p. 1908-1918.
- Matsuzawa, K., K. Fukuyama, P.B. Dirks, S. Hubbard, M. Murakami, L.E. Becker et J.T. Rutka. 1996. «Expression of stromelysin 1 in human astrocytoma cell lines». *J Neurooncol*, vol. 30, p. 181-188.
- McGill, G., A. Shimamura, R.C. Bates, R.E. Savage et D.E. Fisher. 1997. «Loss of matrix adhesion triggers rapid transformation-selective apoptosis in fibroblasts». *The Journal of cell biology*, vol. 138, p. 901-911.
- McNaghy, K.M., F. Rossi, G. Smith et T. Graf. 1996. «The eosinophil-specific cell surface antigen, EOS47, is a chicken homologue of the oncofetal antigen melanotransferrin». *Blood*, vol. 87, p. 1343-1352.
- Mendel, D.B., A.D. Laird, X. Xin, S.G. Louie, J.G. Christensen, G. Li, R.E. Schreck, T.J. Abrams, T.J. Ngai, L.B. Lee, L.J. Murray, J. Carver, E. Chan, K.G. Moss, J.O. Haznedar, J. Sukbuntherng, R.A. Blake, L. Sun, C. Tang, T. Miller, S. Shirazian, G. McMahon et J.M. Cherrington. 2003. «In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship». *Clin Cancer Res*, vol. 9, p. 327-337.
- Michaud-Levesque, J., M. Demeule et R. Beliveau. 2005. «Stimulation of cell surface plasminogen activation by membrane-bound melanotransferrin: a key phenomenon for cell invasion». *Exp Cell Res*, vol. 308, p. 479-490.

- Michaud-Levesque, J., Y. Rolland, M. Demeule, Y. Bertrand et R. Beliveau. 2005. «Inhibition of endothelial cell movement and tubulogenesis by human recombinant soluble melanotransferrin: involvement of the u-PAR/LRP plasminolytic system». *Biochim Biophys Acta*, vol. 1743, p. 243-253.
- Michaud-Levesque, J., M. Demeule et R. Beliveau. 2007. «In vivo inhibition of angiogenesis by a soluble form of melanotransferrin». *Carcinogenesis*, vol. 28, p. 280-288.
- Michaud-Levesque, J., M. Demeule et R. Béliveau. 2007. «Plasminogen-dependent internalization of soluble melanotransferrin involves the low-density lipoprotein receptor-related protein and annexin II». *Biological chemistry*, vol. 388, p. 747-754.
- Mignatti, P. 1995. «Extracellular matrix remodeling by metalloproteinases and plasminogen activators». *Kidney Int Suppl*, vol. 49, p. S12-14.
- Miles, L.A., F.J. Castellino et Y. Gong. 2003. «Critical role for conversion of glu-plasminogen to Lys-plasminogen for optimal stimulation of plasminogen activation on cell surfaces». *Trends Cardiovasc Med*, vol. 13, p. 21-30.
- Moestrup, S.K., S. Nielsen, P. Andreasen, K.E. Jorgensen, A. Nykjaer, H. Roigaard, J. Gliemann et E.I. Christensen. 1993. «Epithelial glycoprotein-330 mediates endocytosis of plasminogen activator-plasminogen activator inhibitor type-1 complexes». *J Biol Chem*, vol. 268, p. 16564-16570.
- Mohan, R., J. Sivak, P. Ashton, L.A. Russo, B.Q. Pham, N. Kasahara, M.B. Raizman et M.E. Fini. 2000. «Curcuminoids inhibit the angiogenic response stimulated by fibroblast growth factor-2, including expression of matrix metalloproteinase gelatinase B». *J Biol Chem*, vol. 275, p. 10405-10412.
- Moncada, S., R. Gryglewski, S. Bunting et J.R. Vane. 1976. «An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation». *Nature*, vol. 263, p. 663-665.
- Monsky, W.L., C. Mouta Carreira, Y. Tsuzuki, T. Gohongi, D. Fukumura et R.K. Jain. 2002. «Role of host microenvironment in angiogenesis and microvascular functions in human breast cancer xenografts: mammary fat pad versus cranial tumors». *Clin Cancer Res*, vol. 8, p. 1008-1013.
- Montgomery, A.M., Y.A. De Clerck, K.E. Langley, R.A. Reisfeld et B.M. Mueller. 1993. «Melanoma-mediated dissolution of extracellular matrix: contribution of urokinase-dependent and metalloproteinase-dependent proteolytic pathways». *Cancer Res*, vol. 53, p. 693-700.
- Moroo, I., M. Ujiie, B.L. Walker, J.W. Tjong, T.Z. Vitalis, D. Karkan, R. Gabathuler, A.R. Moise et W.A. Jefferies. 2003. «Identification of a novel route of iron transcytosis across the mammalian blood-brain barrier». *Microcirculation*, vol. 10, p. 457-462.



- Moser, T.L., M.S. Stack, M.L. Wahl et S.V. Pizzo. 2002. «The mechanism of action of angiotatin: can you teach an old dog new tricks?». *Thromb Haemost*, vol. 87, p. 394-401.
- Murry, B.P., B.E. Blust, A. Singh, T.P. Foster et D. Marchetti. 2006. «Heparanase mechanisms of melanoma metastasis to the brain: Development and use of a brain slice model». *J Cell Biochem*, vol. 97, p. 217-225.
- Myohanen, H. et A. Vaheri. 2004. «Regulation and interactions in the activation of cell-associated plasminogen». *Cell Mol Life Sci*, vol. 61, p. 2840-2858.
- Nappi, A.J. et E. Vass. 2000. «Iron, metalloenzymes and cytotoxic reactions». *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, vol. 46, p. 637-647.
- Naumov, G.N., I.C. MacDonald, P.M. Weinmeister, N. Kerkvliet, K.V. Nadkarni, S.M. Wilson, V.L. Morris, A.C. Groom et A.F. Chambers. 2002. «Persistence of solitary mammary carcinoma cells in a secondary site: a possible contributor to dormancy». *Cancer Res*, vol. 62, p. 2162-2168.
- Neitzel, L.T., C.D. Neitzel, K.L. Magee et M.P. Malafa. 1999. «Angiogenesis correlates with metastasis in melanoma». *Ann Surg Oncol*, vol. 6, p. 70-74.
- Neufeld, G., T. Cohen, S. Gengrinovitch et Z. Poltorak. 1999. «Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors». *Faseb J*, vol. 13, p. 9-22.
- Neuman, T., R.W. Stephens, E.M. Salonen, T. Timmusk et A. Vaheri. 1989. «Induction of morphological differentiation of human neuroblastoma cells is accompanied by induction of tissue-type plasminogen activator». *J Neurosci Res*, vol. 23, p. 274-281.
- Nguyen, T.M., I.V. Subramanian, A. Kelekar et S. Ramakrishnan. 2007. «Kringle 5 of human plasminogen, an angiogenesis inhibitor, induces both autophagy and apoptotic death in endothelial cells». *Blood*, vol. 109, p. 4793-4802.
- Norrby, K. 2004. «Human apo-lactoferrin enhances angiogenesis mediated by vascular endothelial growth factor A in vivo». *J Vasc Res*, vol. 41, p. 293-304.
- Nozaki, S., Y. Endo, H. Nakahara, K. Yoshizawa, T. Ohara et E. Yamamoto. 2006. «Targeting urokinase-type plasminogen activator and its receptor for cancer therapy». *Anticancer Drugs*, vol. 17, p. 1109-1117.
- Nyberg, P., L. Xie et R. Kalluri. 2005. «Endogenous inhibitors of angiogenesis». *Cancer Res*, vol. 65, p. 3967-3979.
- Nykjaer, A., C.M. Petersen, B. Moller, P.H. Jensen, S.K. Moestrup, T.L. Holtet, M. Etzerodt, H.C. Thogersen, M. Munch, P.A. Andreasen et J. Gliemann. 1992. «Purified alpha 2-macroglobulin receptor/LDL receptor-related protein binds urokinase plasminogen activator inhibitor type-1 complex. Evidence that the alpha 2-macroglobulin receptor mediates cellular degradation of urokinase receptor-bound complexes». *J Biol Chem*, vol. 267, p. 14543-

14546.

O'Reilly, M.S., L. Holmgren, Y. Shing, C. Chen, R.A. Rosenthal, Y. Cao, M. Moses, W.S. Lane, E.H. Sage et J. Folkman. 1994. «Angiostatin: a circulating endothelial cell inhibitor that suppresses angiogenesis and tumor growth». *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, vol. 59, p. 471-482.

Oka, N., M. Yamamoto, C. Schwencke, J. Kawabe, T. Ebina, S. Ohno, J. Couet, M.P. Lisanti et Y. Ishikawa. 1997. «Caveolin interaction with protein kinase C. Isoenzyme-dependent regulation of kinase activity by the caveolin scaffolding domain peptide». *The Journal of biological chemistry*, vol. 272, p. 33416-33421.

Okada, S.S., J.E. Tomaszewski et E.S. Barnathan. 1995. «Migrating vascular smooth muscle cells polarize cell surface urokinase receptors after injury in vitro». *Exp Cell Res*, vol. 217, p. 180-187.

Orth, K., E.L. Madison, M.J. Gething, J.F. Sambrook et J. Herz. 1992. «Complexes of tissue-type plasminogen activator and its serpin inhibitor plasminogen-activator inhibitor type 1 are internalized by means of the low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 89, p. 7422-7426.

Ossowski, L. et D. Belin. 1985. «Effect of dimethyl sulfoxide on human carcinoma cells, inhibition of plasminogen activator synthesis, change in cell morphology, and alteration of response to cholera toxin». *Mol Cell Biol*, vol. 5, p. 3552-3559.

Ossowski, L., G. Clunie, M.T. Masucci et F. Blasi. 1991. «In vivo paracrine interaction between urokinase and its receptor: effect on tumor cell invasion». *J Cell Biol*, vol. 115, p. 1107-1112.

Paciucci, R., M. Tora, V.M. Diaz et F.X. Real. 1998. «The plasminogen activator system in pancreas cancer: role of t-PA in the invasive potential in vitro». *Oncogene*, vol. 16, p. 625-633.

Palmieri, D., A.F. Chambers, B. Felding-Habermann, S. Huang et P.S. Steeg. 2007. «The biology of metastasis to a sanctuary site». *Clin Cancer Res*, vol. 13, p. 1656-1662.

Palmieri, G., P.A. Ascierto, A. Cossu, M. Colombino, M. Casula, G. Botti, A. Lissia, F. Tanda et G. Castello. 2003. «Assessment of genetic instability in melanocytic skin lesions through microsatellite analysis of benign naevi, dysplastic naevi, and primary melanomas and their metastases». *Melanoma Res*, vol. 13, p. 167-170.

Pan, W., A.J. Kastin, T.C. Zankel, P. van Kerkhof, T. Terasaki et G. Bu. 2004. «Efficient transfer of receptor-associated protein (RAP) across the blood-brain barrier». *J Cell Sci*, vol. 117, p. 5071-5078.

Papetti, M. et I.M. Herman. 2002. «Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis». *Am J Physiol Cell Physiol*, vol. 282, p. C947-970.

- Parangi, S., M. O'Reilly, G. Christofori, L. Holmgren, J. Grosfeld, J. Folkman et D. Hanahan. 1996. «Antiangiogenic therapy of transgenic mice impairs de novo tumor growth». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 93, p. 2002-2007.
- Parfyonova, Y.V., O.S. Plekhanova et V.A. Tkachuk. 2002. «Plasminogen activators in vascular remodeling and angiogenesis». *Biochemistry (Mosc)*, vol. 67, p. 119-134.
- Patterson, M.L., S.J. Atkinson, V. Knauper et G. Murphy. 2001. «Specific collagenolysis by gelatinase A, MMP-2, is determined by the hemopexin domain and not the fibronectin-like domain». *FEBS Lett*, vol. 503, p. 158-162.
- Pawse, A.R. et U. Tarachand. 1997. «Clot lysis: role of plasminogen activator inhibitors in haemostasis and therapy». *Indian J Exp Biol*, vol. 35, p. 545-552.
- Pearson, J.D. 1991. «Endothelial cell biology». *Radiology*, vol. 179, p. 9-14.
- Pedraza-Farina, L.G. 2006. «Mechanisms of oncogenic cooperation in cancer initiation and metastasis». *Yale J Biol Med*, vol. 79, p. 95-103.
- Pepper, M.S., A.P. Sappino, R. Stocklin, R. Montesano, L. Orci et J.D. Vassalli. 1993. «Upregulation of urokinase receptor expression on migrating endothelial cells». *J Cell Biol*, vol. 122, p. 673-684.
- Perides, G., Y. Zhuge, T. Lin, M.F. Stins, R.T. Bronson et J.K. Wu. 2006. «The fibrinolytic system facilitates tumor cell migration across the blood-brain barrier in experimental melanoma brain metastasis». *BMC Cancer*, vol. 6, p. 56.
- Petersen, L.C., L.R. Lund, L.S. Nielsen, K. Dano et L. Skriver. 1988. «One-chain urokinase-type plasminogen activator from human sarcoma cells is a proenzyme with little or no intrinsic activity». *J Biol Chem*, vol. 263, p. 11189-11195.
- Polette, M., B. Nawrocki-Raby, C. Gilles, C. Clavel et P. Birembaut. 2004. «Tumour invasion and matrix metalloproteinases». *Crit Rev Oncol Hematol*, vol. 49, p. 179-186.
- Pollanen, J., R.W. Stephens et A. Vaheri. 1991. «Directed plasminogen activation at the surface of normal and malignant cells». *Adv Cancer Res*, vol. 57, p. 273-328.
- Poltorak, Z., T. Cohen, R. Sivan, Y. Kandelis, G. Spira, I. Vlodavsky, E. Keshet et G. Neufeld. 1997. «VEGF145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix». *J Biol Chem*, vol. 272, p. 7151-7158.
- Ponting, C.P., J.M. Marshall et S.A. Cederholm-Williams. 1992. «Plasminogen: a structural review». *Blood Coagul Fibrinolysis*, vol. 3, p. 605-614.
- Posner, J.B. 1996. «Brain metastases: 1995. A brief review». *J Neurooncol*, vol. 27, p. 287-293.

- Poulsom, R., M. Pignatelli, W.G. Stetler-Stevenson, L.A. Liotta, P.A. Wright, R.E. Jeffery, J.M. Longcroft, L. Rogers et G.W. Stamp. 1992. «Stromal expression of 72 kda type IV collagenase (MMP-2) and TIMP-2 mRNAs in colorectal neoplasia». *Am J Pathol*, vol. 141, p. 389-396.
- Presta, L.G., H. Chen, S.J. O'Connor, V. Chisholm, Y.G. Meng, L. Krummen, M. Winkler et N. Ferrara. 1997. «Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders». *Cancer Res*, vol. 57, p. 4593-4599.
- Price, D.J., S. Avraham, J. Feuerstein, Y. Fu et H.K. Avraham. 2002. «The invasive phenotype in HMT-3522 cells requires increased EGF receptor signaling through both PI 3-kinase and ERK 1,2 pathways». *Cell Commun Adhes*, vol. 9, p. 87-102.
- Price, J.E. 1996. «Metastasis from human breast cancer cell lines». *Breast Cancer Res Treat*, vol. 39, p. 93-102.
- Rakic, J.M., C. Maillard, M. Jost, K. Bajou, V. Masson, L. Devy, V. Lambert, J.M. Foidart et A. Noel. 2003. «Role of plasminogen activator-plasmin system in tumor angiogenesis». *Cell Mol Life Sci*, vol. 60, p. 463-473.
- Ramsohoye, P.V. et I.B. Fritz. 1998. «Preliminary characterization of glial-secreted factors responsible for the induction of high electrical resistances across endothelial monolayers in a blood-brain barrier model». *Neurochem Res*, vol. 23, p. 1545-1551.
- Ravi, R., B. Mookerjee, Z.M. Bhujwalla, C.H. Sutter, D. Artemov, Q. Zeng, L.E. Dillehay, A. Madan, G.L. Semenza et A. Bedi. 2000. «Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha». *Genes Dev*, vol. 14, p. 34-44.
- Re, F., A. Zanetti, M. Sironi, N. Polentarutti, L. Lanfranccone, E. Dejana et F. Colotta. 1994. «Inhibition of anchorage-dependent cell spreading triggers apoptosis in cultured human endothelial cells». *The Journal of cell biology*, vol. 127, p. 537-546.
- Reddig, P.J. et R.L. Juliano. 2005. «Clinging to life: cell to matrix adhesion and cell survival». *Cancer Metastasis Rev*, vol. 24, p. 425-439.
- Reijerkerk, A., E.E. Voest et M.F. Gebbink. 2000. «No grip, no growth: the conceptual basis of excessive proteolysis in the treatment of cancer». *Eur J Cancer*, vol. 36, p. 1695-1705.
- Reijerkerk, A., L.O. Mosnier, O. Kranenburg, B.N. Bouma, P. Carmeliet, T. Drixler, J.C. Meijers, E.E. Voest et M.F. Gebbink. 2003. «Amyloid endostatin induces endothelial cell detachment by stimulation of the plasminogen activation system». *Mol Cancer Res*, vol. 1, p. 561-568.
- Reinartz, J., B. Schaefer, M.J. Bechtel et M.D. Kramer. 1996. «Plasminogen activator inhibitor type-2 (PAI-2) in human keratinocytes regulates pericellular urokinase-type plasminogen activator». *Exp Cell Res*, vol. 223, p. 91-101.

- Richardson, D.R. 2000. «The role of the membrane-bound tumour antigen, melanotransferrin (p97), in iron uptake by the human malignant melanoma cell». *Eur J Biochem*, vol. 267, p. 1290-1298.
- Richardson, D.R. et E.H. Morgan. 2004. «The transferrin homologue, melanotransferrin (p97), is rapidly catabolized by the liver of the rat and does not effectively donate iron to the brain». *Biochim Biophys Acta*, vol. 1690, p. 124-133.
- Riedle, S., M. Rosel et M. Zoller. 1998. «In vivo activation and expansion of T cells by a bi-specific antibody abolishes metastasis formation of human melanoma cells in SCID mice». *Int J Cancer*, vol. 75, p. 908-918.
- Rijken, D.C. et D. Collen. 1981. «Purification and characterization of the plasminogen activator secreted by human melanoma cells in culture». *J Biol Chem*, vol. 256, p. 7035-7041.
- Risau, W. et I. Flamme. 1995. «Vasculogenesis». *Annu Rev Cell Dev Biol*, vol. 11, p. 73-91.
- Robbins, K.C. et L. Summaria. 1976. «Plasminogen and plasmin». *Methods Enzymol*, vol. 45, p. 257-273.
- Rolland, Y., M. Demeule et R. Beliveau. 2006. «Melanotransferrin stimulates t-PA-dependent activation of plasminogen in endothelial cells leading to cell detachment». *Biochim Biophys Acta*, vol. 1763, p. 393-401.
- Rolland, Y., M. Demeule, J. Michaud-Levesque et R. Beliveau. 2007. «Inhibition of tumor growth by a truncated and soluble form of melanotransferrin». *Exp Cell Res*, vol. 313, p. 2910-2919.
- Romanic, A.M. et J.A. Madri. 1994. «The induction of 72-kD gelatinase in T cells upon adhesion to endothelial cells is VCAM-1 dependent». *J Cell Biol*, vol. 125, p. 1165-1178.
- Romer, L.H., K.G. Birukov et J.G. Garcia. 2006. «Focal adhesions: paradigm for a signaling nexus». *Circ Res*, vol. 98, p. 606-616.
- Rose, T.M., G.D. Plowman, D.B. Teplow, W.J. Dreyer, K.E. Hellstrom et J.P. Brown. 1986. «Primary structure of the human melanoma-associated antigen p97 (melanotransferrin) deduced from the mRNA sequence». *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 83, p. 1261-1265.
- Rothenberger, S., M.R. Food, R. Gabathuler, M.L. Kennard, T. Yamada, O. Yasuhara, P.L. McGeer et W.A. Jefferies. 1996. «Coincident expression and distribution of melanotransferrin and transferrin receptor in human brain capillary endothelium». *Brain Res*, vol. 712, p. 117-121.
- Rundhaug, J.E. 2005. «Matrix metalloproteinases and angiogenesis». *J Cell Mol Med*, vol. 9, p. 267-285.

- Ruohola, J.K., E.M. Valve, M.J. Karkkainen, V. Joukov, K. Alitalo et P.L. Harkonen. 1999. «Vascular endothelial growth factors are differentially regulated by steroid hormones and antiestrogens in breast cancer cells». *Mol Cell Endocrinol*, vol. 149, p. 29-40.
- Saksela, O. et D.B. Rifkin. 1990. «Release of basic fibroblast growth factor-heparan sulfate complexes from endothelial cells by plasminogen activator-mediated proteolytic activity». *J Cell Biol*, vol. 110, p. 767-775.
- Sala, R., W.A. Jefferies, B. Walker, J. Yang, J. Tiong, S.K. Law, M.F. Carlevaro, E. Di Marco, A. Vacca, R. Cancedda, F.D. Cancedda et D. Ribatti. 2002. «The human melanoma associated protein melanotransferrin promotes endothelial cell migration and angiogenesis in vivo». *Eur J Cell Biol*, vol. 81, p. 599-607.
- Sargiacomo, M., M. Sudol, Z. Tang et M.P. Lisanti. 1993. «Signal transducing molecules and glycosyl-phosphatidylinositol-linked proteins form a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells». *J Cell Biol*, vol. 122, p. 789-807.
- Sato, Y., K. Okamura, A. Morimoto, R. Hamanaka, K. Hamaguchi, T. Shimada, M. Ono, K. Kohno, T. Sakata et M. Kuwano. 1993. «Indispensable role of tissue-type plasminogen activator in growth factor-dependent tube formation of human microvascular endothelial cells in vitro». *Exp Cell Res*, vol. 204, p. 223-229.
- Schilling, L. et M. Wahl. 1997. «Brain edema: pathogenesis and therapy». *Kidney international*, vol. 59, p. S69-75.
- Schmitt, M., N. Harbeck, C. Thomssen, O. Wilhelm, V. Magdolen, U. Reuning, K. Ulm, H. Hofler, F. Janicke et H. Graeff. 1997. «Clinical impact of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis: prognostic relevance and target for therapy». *Thromb Haemost*, vol. 78, p. 285-296.
- Sechler, J.L. et J.E. Schwarzbauer. 1998. «Control of cell cycle progression by fibronectin matrix architecture». *The Journal of biological chemistry*, vol. 273, p. 25533-25536.
- Seiffert, D., J. Mimuro, R.R. Schleef et D.J. Loskutoff. 1990. «Interactions between type 1 plasminogen activator inhibitor, extracellular matrix and vitronectin». *Cell Differ Dev*, vol. 32, p. 287-292.
- Sekyere, E. et D.R. Richardson. 2000. «The membrane-bound transferrin homologue melanotransferrin: roles other than iron transport?». *FEBS Lett*, vol. 483, p. 11-16.
- Sekyere, E., L.L. Dunn et D.R. Richardson. 2003. «The double-edged nature of using genetic databases: melanotransferrin genes and transcripts». *FEBS Lett*, vol. 547, p. 233.
- Sekyere, E.O., L.L. Dunn et D.R. Richardson. 2005. «Examination of the distribution of the transferrin homologue, melanotransferrin (tumour antigen p97), in mouse and human». *Biochim Biophys Acta*, vol. 1722, p. 131-142.

- Sekyere, E.O., L.L. Dunn, Y.S. Rahmanto et D.R. Richardson. 2006. «Role of melanotransferrin in iron metabolism: studies using targeted gene disruption in vivo». *Blood*, vol. 107, p. 2599-2601.
- Seligman, P.A., C.D. Butler, E.J. Massey, J.A. Kaur, J.P. Brown, G.D. Plowman, Y. Miller et C. Jones. 1986. «The p97 antigen is mapped to the q24-qter region of chromosome 3; the same region as the transferrin receptor». *Am J Hum Genet*, vol. 38, p. 540-548.
- Senger, D.R., S.J. Galli, A.M. Dvorak, C.A. Perruzzi, V.S. Harvey et H.F. Dvorak. 1983. «Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid». *Science*, vol. 219, p. 983-985.
- Sharma, M.C. et M. Sharma. 2007. «The role of annexin II in angiogenesis and tumor progression: a potential therapeutic target». *Current pharmaceutical design*, vol. 13, p. 3568-3575.
- Sharom, F.J. et M.T. Lehto. 2002. «Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins: structure, function, and cleavage by phosphatidylinositol-specific phospholipase C». *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, vol. 80, p. 535-549.
- Shibuya, M. 2006. «Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis». *J Biochem Mol Biol*, vol. 39, p. 469-478.
- Shimamura, M., Y. Yamamoto, H. Ashino, T. Oikawa, T. Hazato, H. Tsuda et M. Iigo. 2004. «Bovine lactoferrin inhibits tumor-induced angiogenesis». *Int J Cancer*, vol. 111, p. 111-116.
- Shweiki, D., A. Itin, G. Neufeld, H. Gitay-Goren et E. Keshet. 1993. «Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally regulated angiogenesis». *J Clin Invest*, vol. 91, p. 2235-2243.
- Siders, W.M., P.W. Wright, J.A. Hixon, W.G. Alvord, T.C. Back, R.H. Wiltout et R.G. Fenton. 1998. «T cell- and NK cell-independent inhibition of hepatic metastases by systemic administration of an IL-12-expressing recombinant adenovirus». *J Immunol*, vol. 160, p. 5465-5474.
- Singh, R.K., M. Gutman, C.D. Bucana, R. Sanchez, N. Llansa et I.J. Fidler. 1995. «Interferons alpha and beta down-regulate the expression of basic fibroblast growth factor in human carcinomas». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 92, p. 4562-4566.
- Song, K.S., S. Li, T. Okamoto, L.A. Quilliam, M. Sargiacomo et M.P. Lisanti. 1996. «Co-purification and direct interaction of Ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains. Detergent-free purification of caveolae microdomains». *The Journal of biological chemistry*, vol. 271, p. 9690-9697.
- Spandidos, D.A. 1986. «A unified theory for the development of cancer». *Bioscience reports*, vol. 6, p. 691-708.



- Spence, A.P. et E.B. Mason. 1983. «Système circulatoire, vaisseaux sanguins et lymphatiques». In: *Anatomie et physiologie : une approche intégrée*, p. 517-566. Montréal: Éditions du Renouveau Pédagogique.
- Stalboerger, P.G., C.J. Panetta, R.D. Simari et N.M. Caplice. 2001. «Plasmin proteolysis of endothelial cell and vessel wall associated tissue factor pathway inhibitor». *Thromb Haemost*, vol. 86, p. 923-928.
- Stearns, M.E., M. Wang et K. Fudge. 1993. «Liarozole and 13-cis-retinoic acid anti-prostatic tumor activity». *Cancer Res*, vol. 53, p. 3073-3077.
- Steeg, P.S. 2003. «Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells». *Nat Rev Cancer*, vol. 3, p. 55-63.
- Stern, M. et R. Herrmann. 2005. «Overview of monoclonal antibodies in cancer therapy: present and promise». *Crit Rev Oncol Hematol*, vol. 54, p. 11-29.
- Stockinger, W., E. Hengstschlager-Ottstad, S. Novak, A. Matus, M. Huttinger, J. Bauer, H. Lassmann, W.J. Schneider et J. Nimpf. 1998. «The low density lipoprotein receptor gene family. Differential expression of two alpha2-macroglobulin receptors in the brain». *J Biol Chem*, vol. 273, p. 32213-32221.
- Stubbs, M.T., M. Renatus et W. Bode. 1998. «An active zymogen: unravelling the mystery of tissue-type plasminogen activator». *Biol Chem*, vol. 379, p. 95-103.
- Sun, Z., Y.H. Chen, P. Wang, J. Zhang, V. Gurewich, P. Zhang et J.N. Liu. 2002. «The blockage of the high-affinity lysine binding sites of plasminogen by EACA significantly inhibits prourokinase-induced plasminogen activation». *Biochim Biophys Acta*, vol. 1596, p. 182-192.
- Takahashi, T., S. Yamaguchi, K. Chida et M. Shibuya. 2001. «A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells». *Embo J*, vol. 20, p. 2768-2778.
- Tarui, T., M. Majumdar, L.A. Miles, W. Ruf et Y. Takada. 2002. «Plasmin-induced migration of endothelial cells. A potential target for the anti-angiogenic action of angiostatin». *J Biol Chem*, vol. 277, p. 33564-33570.
- Thomas, A.L., B. Morgan, J. Dreves, C. Unger, B. Wiedenmann, U. Vanhoefer, D. Laurent, M. Dugan et W.P. Steward. 2003. «Vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors: PTK787/ZK 222584». *Semin Oncol*, vol. 30, p. 32-38.
- Tischer, E., R. Mitchell, T. Hartman, M. Silva, D. Gospodarowicz, J.C. Fiddes et J.A. Abraham. 1991. «The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing». *J Biol Chem*, vol. 266, p. 11947-11954.



Tosetti, F., N. Ferrari, S. De Flora et A. Albini. 2002. «Angioprevention': angiogenesis is a common and key target for cancer chemopreventive agents». *FASEB J*, vol. 16, p. 2-14.

Tremblay, P.L., F.A. Auger et J. Huot. 2006. «Regulation of transendothelial migration of colon cancer cells by E-selectin-mediated activation of p38 and ERK MAP kinases». *Oncogene*, vol. 25, p. 6563-6573.

Tsatas, D., M.S. Baker et G.E. Rice. 1997. «Tissue-specific expression of the relaxed conformation of plasminogen activator inhibitor-2 and low-density lipoprotein receptor-related protein in human term gestational tissues». *J Histochem Cytochem*, vol. 45, p. 1593-1602.

Tsatas, D. et A.H. Kaye. 2003. «The role of the plasminogen activation cascade in glioma cell invasion: a review». *J Clin Neurosci*, vol. 10, p. 139-145.

Tzen, C.Y., D.N. Estervig, P. Minoo, M. Filipak, P.B. Maercklein, B.J. Hoerl et R.E. Scott. 1988. «Differentiation, cancer, and anticancer activity». *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, vol. 66, p. 478-489.

Ujiie, M., D.L. Dickstein et W.A. Jefferies. 2002. «p97 as a biomarker for Alzheimer disease». *Front Biosci*, vol. 7, p. e42-47.

Urbanski, S.J., D.R. Edwards, A. Maitland, K.J. Leco, A. Watson et A.E. Kossakowska. 1992. «Expression of metalloproteinases and their inhibitors in primary pulmonary carcinomas». *Br J Cancer*, vol. 66, p. 1188-1194.

van Hinsbergh, V.W., D. Binnema, M.A. Scheffer, E.D. Sprengers, T. Kooistra et D.C. Rijken. 1987. «Production of plasminogen activators and inhibitor by serially propagated endothelial cells from adult human blood vessels». *Arteriosclerosis*, vol. 7, p. 389-400.

Verderio, E.A., D. Telci, A. Okoye, G. Melino et M. Griffin. 2003. «A novel RGD-independent cell adhesion pathway mediated by fibronectin-bound tissue transglutaminase rescues cells from anoikis». *The Journal of biological chemistry*, vol. 278, p. 42604-42614.

Visse, R. et H. Nagase. 2003. «Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry». *Circ Res*, vol. 92, p. 827-839.

Vogelstein, B. et K.W. Kinzler. 1993. «The multistep nature of cancer». *Trends Genet*, vol. 9, p. 138-141.

Vu, T.H. et Z. Werb. 2000. «Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology». *Genes Dev*, vol. 14, p. 2123-2133.

Waldmann, T.A. 2003. «Immunotherapy: past, present and future». *Nat Med*, vol. 9, p. 269-277.

Walsh, K., R.C. Smith et H.S. Kim. 2000. «Vascular cell apoptosis in remodeling, restenosis,

and plaque rupture». *Circulation research*, vol. 87, p. 184-188.

Wang, D., J.C. Anderson et C.L. Gladson. 2005. «The role of the extracellular matrix in angiogenesis in malignant glioma tumors». *Brain Pathol*, vol. 15, p. 318-326.

Wang, H.U., Z.F. Chen et D.J. Anderson. 1998. «Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4». *Cell*, vol. 93, p. 741-753.

Wang, J.M., S. Kumar, D. Pye, N. Haboubi et L. al-Nakib. 1994. «Breast carcinoma: comparative study of tumor vasculature using two endothelial cell markers». *J Natl Cancer Inst*, vol. 86, p. 386-388.

Wang, W., W.L. Dentler et R.T. Borchardt. 2001. «VEGF increases BMEC monolayer permeability by affecting occludin expression and tight junction assembly». *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, vol. 280, p. H434-440.

Webb, D.J., D.H. Nguyen et S.L. Gonias. 2000. «Extracellular signal-regulated kinase functions in the urokinase receptor-dependent pathway by which neutralization of low density lipoprotein receptor-related protein promotes fibrosarcoma cell migration and matrigel invasion». *J Cell Sci*, vol. 113 ( Pt 1), p. 123-134.

Weil, R.J., D.C. Palmieri, J.L. Bronder, A.M. Stark et P.S. Steeg. 2005. «Breast cancer metastasis to the central nervous system». *Am J Pathol*, vol. 167, p. 913-920.

Wen, P.Y. et J.S. Loeffler. 2001. «Cancer: Principles and Practice of Oncology (ed 6)». In, p. 2655-2670. Philadelphia

Werb, Z., C.J. Sympton, C.M. Alexander, N. Thomasset, L.R. Lund, A. MacAuley, J. Ashkenas et M.J. Bissell. 1996. «Extracellular matrix remodeling and the regulation of epithelial-stromal interactions during differentiation and involution». *Kidney international*, vol. 54, p. S68-74.

Westermarck, J. et V.M. Kahari. 1999. «Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion». *Faseb J*, vol. 13, p. 781-792.

Willnow, T.E., J.M. Moehring, N.M. Inocencio, T.J. Moehring et J. Herz. 1996. «The low-density-lipoprotein receptor-related protein (LRP) is processed by furin in vivo and in vitro». *Biochem J*, vol. 313 ( Pt 1), p. 71-76.

Wiman, B. et D. Collen. 1978. «On the kinetics of the reaction between human antiplasmin and plasmin». *Eur J Biochem*, vol. 84, p. 573-578.

Witz, I.P. 2006. «The involvement of selectins and their ligands in tumor-progression». *Immunol Lett*, vol. 104, p. 89-93.

Woodbury, R.G., J.P. Brown, M.Y. Yeh, I. Hellstrom et K.E. Hellstrom. 1980.

«Identification of a cell surface protein, p97, in human melanomas and certain other neoplasms». *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 77, p. 2183-2187.

Yamada, T., Y. Tsujioka, J. Taguchi, M. Takahashi, Y. Tsuboi, I. Moroo, J. Yang et W.A. Jefferies. 1999. «Melanotransferrin is produced by senile plaque-associated reactive microglia in Alzheimer's disease». *Brain Res*, vol. 845, p. 1-5.

Yamashita, J., K. Inada, S. Yamashita, Y. Nakashima, S. Matsuo et M. Ogawa. 1992. «Tissue-type plasminogen activator is involved in skeletal metastasis from human breast cancer». *International journal of clinical & laboratory research*, vol. 21, p. 227-230.

Yang, J., J. Tjong, M. Kennard et W.A. Jefferies. 2004. «Deletion of the GPI pre-anchor sequence in human p97--a general approach for generating the soluble form of GPI-linked proteins». *Protein Expr Purif*, vol. 34, p. 28-48.

Yang, J.C. 2004. «Bevacizumab for patients with metastatic renal cancer: an update». *Clin Cancer Res*, vol. 10, p. 6367S-6370S.

Yao, Y., T. Kubota, K. Sato, R. Kitai, H. Takeuchi et H. Arishima. 2001. «Prognostic value of vascular endothelial growth factor and its receptors Flt-1 and Flk-1 in astrocytic tumours». *Acta Neurochir (Wien)*, vol. 143, p. 159-166.

Yao, Y., T. Kubota, H. Takeuchi et K. Sato. 2005. «Prognostic significance of microvessel density determined by an anti-CD105/endoglin monoclonal antibody in astrocytic tumors: comparison with an anti-CD31 monoclonal antibody». *Neuropathology*, vol. 25, p. 201-206.

Ye, R.D., T.C. Wun et J.E. Sadler. 1988. «Mammalian protein secretion without signal peptide removal. Biosynthesis of plasminogen activator inhibitor-2 in U-937 cells». *J Biol Chem*, vol. 263, p. 4869-4875.

Yoon, S.O., S.J. Park, C.H. Yun et A.S. Chung. 2003. «Roles of matrix metalloproteinases in tumor metastasis and angiogenesis». *J Biochem Mol Biol*, vol. 36, p. 128-137.

Yoshimura, I., Y. Mizuguchi, A. Miyajima, T. Asano, T. Tadakuma et M. Hayakawa. 2004. «Suppression of lung metastasis of renal cell carcinoma by the intramuscular gene transfer of a soluble form of vascular endothelial growth factor receptor I». *J Urol*, vol. 171, p. 2467-2470.

Yuan, A., C.J. Yu, K.T. Luh, S.H. Kuo, Y.C. Lee et P.C. Yang. 2002. «Aberrant p53 expression correlates with expression of vascular endothelial growth factor mRNA and interleukin-8 mRNA and neoangiogenesis in non-small-cell lung cancer». *J Clin Oncol*, vol. 20, p. 900-910.

Zhang, Z., L. Zhang, M. Yepes, Q. Jiang, Q. Li, P. Arniego, T.A. Coleman, D.A. Lawrence et M. Chopp. 2002. «Adjuvant treatment with neuroserpin increases the therapeutic window for tissue-type plasminogen activator administration in a rat model of embolic stroke». *Circulation*, vol. 106, p. 740-745.

Zheng, G., D.R. Bachinsky, I. Stamenkovic, D.K. Strickland, D. Brown, G. Andres et R.T. McCluskey. 1994. «Organ distribution in rats of two members of the low-density lipoprotein receptor gene family, gp330 and LRP/alpha 2MR, and the receptor-associated protein (RAP)». *J Histochem Cytochem*, vol. 42, p. 531-542.

Zucker, S., H. Mirza, C.E. Conner, A.F. Lorenz, M.H. Drews, W.F. Bahou et J. Jesty. 1998. «Vascular endothelial growth factor induces tissue factor and matrix metalloproteinase production in endothelial cells: conversion of prothrombin to thrombin results in progelatinase A activation and cell proliferation». *Int J Cancer*, vol. 75, p. 780-786.